

World Organization for Intellectual Property Rights
International Office

INTERNATIONAL REGISTRATION PUBLISHED IN ACCORDANCE WITH THE CONTRACT ON
INTERNATIONAL CO-OPERATION IN THE FIELD OF PATENTS (PCT)

(51) International Patent Classification⁶: (11) International publication Number: **WO 96/23506**

A61K 31/70

A1

(43) International Publication Date: 8th August 1996
(8/8/96)

(21) International Reference Number:
PCT/DE96/00169

(81) Signatory States: BR, JP, KR, MX, NO, US,
European Patent(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB,
GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(22) International Registration Date:
31st January 1996 (1/31/96)

(30) Priority Dates:
195 03 152.0 1st February 1996 (2/1/96) DE
195 45 892.3 8th December 1996 (12/8/96) DE

Published:
With International Search Report
Prior to lapsing of the time limit for changes to the claims
Publication will be repeated if changes occur

(71) Registrants (*for all States except the US*)
FRAUNHOFER SOCIETY FOR THE PROMOTION
OF APPLIED RESEARCH E.V. [DE/DE]
Leonrod St. 54, D-80636 Munich

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Registrant (*only for US*): FAHRIG, Rudolf [DE/DE];
Fritz-Goy-Way 3, D-30657 Hannover (DE). STEINKAMP-
ZUCHT, Angela [DE/DE]; Roon St. 3, D-30161
Hannover (DE).

(74) Legal Representative: BUTENSCOEN, BERGMANN,
NOETH, REITZLE, GRAMBOW, KRAUS; Mozart St. 17,
D-80336 Munich

(54) Title: USE OF 5-SUBSTITUTED NUCLEOSIDES TO PREVENT THE DEVELOPMENT OF
RESISTANCE DURING TREATMENT WITH CYTOSTATIC AGENTS CONTAINING SAID
NUCLEOSIDES

(54) [Title text repeated in German]

(57) Abstract:

The invention involves the use of 5-substituted nucleosides in combination with at least one
cytostatic agent in the production of a medicament which prevents or reduces the development of resistance
during treatment with cytostatic agents, as well as a medicament containing BVDU and/or its metabolites.

(57) [Abstract text repeated in German]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THE USE OF 5-SUBSTITUTED NUCLEOSIDES TO REDUCE THE DEVELOPMENT OF RESISTANCE
DURING TREATMENT WITH CYTOSTATIC AGENTS CONTAINING THESE NUCLEOSIDES

5

10 The appearance of "drug resistance" is the main cause of failure in cancer chemotherapy. Tumors
which respond initially to cytostatic agents very often recover after a period of treatment and are
then resistant to the action of a variety of anti-neoplastic agents. Although "drug resistance" has
been a recognized problem since 1948, when cancer therapy with cytostatic agents began, to date
no method has been found to prevent the development of resistance. All highly resistant tumors,
15 which have been investigated so far, have shown amplification (duplication) of a small group of
genes. This DNA or gene amplification can be shown to result in increased expression of the gene,
which leads to resistance to the drug.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

This DNA amplification can be shown to result in increased expression of various genes. Protective proteins, which serve to exclude poisons from the cell, can be over-produced in this way (P-glycoprotein). This effect is named "multi-drug resistance" (MDR).

5 In addition to MDR, the degree of amplification of certain genes, particularly some oncogenes, correlates with the degree of malignancy. As a result, the chances of surviving gastric cancer with amplification of ERV2, RASKI, INT3, HST1, MYC and KSRAM (Hirohasi, S, and Sugimura, T. Genetic alterations in human gastric cancer. *Cancer cells* (Cold Spring Harbor), 3: 49-52, 1991) or ovarian cancer with ERBB2 and MYC (Sasano, H., Garrett, C.T., Wilkinson, D.S., Silverberg, S. Comerford, J., and Hyde, J. Protooncogene amplification and tumor ploidy in human ovarian neoplasm. *Hum. Pathol.*, 21: 382-391, 1990) are very poor. In breast cancer, the amplification of MYC (Borg, A., Baldetorp, B., Fernö, M., Olsson, H., and Sigurdsson, H. C-myc amplification is an independent prognostic factor in postmenopausal breast cancer. *Int. J. Cancer*, 51:687-691, 1992) and co-amplification of INT2 and HST1 (Borg, A., Sigurdsson, H., Clark, G.M., et al., Association of INT2/HST1 coamplification in primary breast cancer with hormone-dependant phenotype and poor prognosis. *Br. J. Cancer*, 63:136-142, 1991) correlate with the prognosis. The amplification of ERBB2 (Descotes, F., Pavy, J.-J., and Adessi, G.L. Human breast cancer: Correlation study between HER-2/neu amplification and prognostic factor in an unselected population. *Anticancer Res.*, 13:119-124, 1993) and EGFR (Klijn, J.G.M., Barns, P.M.J.J., Schmitz, P.I.M, and Foekens, J.A. The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review of 5232 patients. *Endocr. Rev.* 13:3-17, 1992) is associated with a poor prognosis. In esophageal carcinoma, co-amplification of HST1 and INT2 correlates with the extent of metastasis (Tsuda, T., Tahara, E., Kajiyama, G., Sakamoto, H., Terada, M., and Sugimura, T. High incidence of coamplification of hst-1 and int-2 genes in human esophageal carcinoma. *Cancer Res.* 49:5505-5508, 1989).

In summary, it has been established that gene amplification induced by chronic treatment with carcinogenic cytostatic agents leads not only to resistance to these agents, but also to over expression of certain oncogenes which control the degree of malignancy.

30 A range of substances has been described which counteract drug resistance when it develops. These include the anti-cancer actions of the protease inhibitors described in the work of Kennedy (Kennedy, A.R., Prevention of carcinogenesis by protease inhibitors, *Cancer Res.* 54:1999-2005, 1994). These can reduce the levels of carcinogen-induced gene amplification to near normal. Kennedy observed that radiation-induced gene amplification is depressed in a similar way, implying

THIS PAGE BLANK (USPTO)

a connection between the two processes. In addition, protease inhibitors also act as antagonists of (co-recombinant) tumor promoters by triggering transformation *in vitro*. Protease inhibitors are also described as potent anti-promoters in *in vivo* studies (Troll, W., Klassen, A., and Janoff, A. Tumorigenesis in mouse skin: inhibition by synthetic inhibitors of proteases. Science (Washington DC) 169:1211-1213,1970).

The work of Moscow & Cowan (Moscow, I.A., and Cowan, K.H. Multidrug resistance. J. Natl. Cancer Inst. 80: 14-20,1988) has shown that Verapamil counteracts MDR. This "calcium channel antagonist" increases cytotoxicity by enhancing the intracellular accumulation of pharmaceutical agents. It is likely that this is achieved by an action upon P-glycoprotein, or upon other transport proteins. The toxicity of this and similar agents such as Quinidine, for example, prevents them from being used clinically.

Starting from this premise, it is the aim of the current invention to develop a substance, which is effective in preventing or reducing the development of resistance to cytostatic agents, and to produce a corresponding pharmaceutical agent.

This task with respect to a substance is achieved by the attributes described in Claim 1, and with respect to a pharmaceutical agent by the attributes described in Claim 9.

In this invention, it is proposed that simultaneous administration of a 5-substituted nucleoside together with a cytostatic agent prevents or reduces the development of resistance. Surprisingly, it transpired that the 5- nucleoside prevents, or at least diminishes, the development of carcinogen-induced gene amplification. This raises the possibility, by co-administration of these nucleosides and cytostatic agents, not only of preventing the development of resistance to the cytostatic agent, but also of influencing the degree of tumor malignancy.

The following are some examples of 5-nucleosides: 5-(2-bromovinyl)-2-deoxyuridine (BVDU), (E)-5-(2-bromovinyl)-1- β -D-arabinofuranosyluracil, (E)-5-(2-bromovinyl)-2-deoxy-4-thiouridine. Fig. 2: 5-Iodo-2-deoxycytidine, 5-Iodo-2-deoxyuridine, 2[#]-Deoxy-5-trifluoromethyluridine, particularly favorable being BVDU and (E)-5-(2-bromovinyl)-uracil (BVU).

The invention also pertains to pharmaceutical agents aimed at preventing the development of resistance to cytostatic agents, which contain 5 nucleosides. In this case, the pharmaceutical agent

THIS PAGE BLANK (USPTO)

is formulated with a 5- nucleoside content sufficient to produce a blood level of 0.02 to 10 µg/ml. Experiments demonstrated that the optimal range lies between 0.05 and 5 µg/ml.

5 In this way, the content of the cytostatic agent in the formulation can be kept at the currently familiar level (Oshiro, Y., Piper, C.E., Balwierz, P.S., and Garriot, M.L. (1992) Genotoxic properties of (E)-5-(2-bromovinyl)-2-deoxyuridine (BVDU). Fundamental and applied Toxicology, 18, 491-498). Examples of cytostatic agents include Cyclophosphamide and other alkylating agents, anti-metabolites such as Methotrexate, Alkaloids such as Vinblastine, Antibiotics such as Bleomycin, Cisplatin and other substances. Further examples of cytostatic agents can be found in 10 the "red list 1995", Editio Cantor Medical & Scientific Press, Aulendorf/Wuertt., 1995.

15 The carriers, additives and excipients remain the same as those in current usage. The pharmaceutical agent itself can be made as a solid, a liquid or a spray.

The invention is elaborated below using experimental models.

20 A. Model substances

Experiments on amplification phenomena are performed using a hamster cell line containing a virus (Simian Virus 40) integrated into the genome. The application of both genotoxic substances and various other carcinogenic and tumor-promoting but non-genotoxic substances to this cell line is known to lead to amplification of the SV40 genome in the hamster genome. The method relies 25 upon the hybridization of the probe, labeled SV40-DNA, with hamster cell DNA containing SV40 in amplified copies. The amount of bound probe gives information on the degree of amplification of the integrated viral DNA.

30 In order to ascertain the degree of amplification, the albumin gene DNA is measured at the same time as the SV40-DNA. In contrast to the SV40-DNA, the albumin gene DNA is not amplified in the cell. The value of the relative SV40-DNA content is derived from the ratio of the signal from the SV40-DNA hybridized probe to that from the albumin gene hybridized probe from the same SV40-transformed embryonic CD631 hamster cells.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

The following were used as model substances:

1. Mutagenic and recombinogenic genotoxic carcinogens (positive controls)
Triethylenemelamine (TEM)
4-Nitroquinoline 1-Oxide (4-NQO)
 2. Non-carcinogens (negative controls) which neither induced mutation nor recombination
Acetone
Dimethylformide
 3. Co-recombinogenic tumor promoters
Mezerein
12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA)
Chrysarobine
Coumarin
 3. Recombinogenic, non-genotoxic carcinogens with unknown mechanisms of action
Thioacetamide
Acetamide
 4. Testosterone after metabolism by rat liver microsomes (S9 mix) as well as without S9 mix
Testosterone acting
with S9 mix as an anti-recombinant and
without S9 mix as a co-recombinant
- The actions of the above named model substances were examined alone and in combination with a carcinogen in the gene amplification system.
- The results with these model substances are summarized in Figures 1 to 3.
- The non-carcinogenic acetone and dimethylformide show no effect.
- All other substances, the non-genotoxic carcinogens with uncertain mechanism of action, Thioacetamide and Acetamide, the genotoxic carcinogens TEM and 4-NQO as well as the tumor promoters Mezerein, 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA), Chrysarobine and Coumarin, when given alone, increase the SV40 gene amplification.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Testosterone with S9 mix reduces the amplifying effect of Methotrexate (MTX), and without S9 mix it increases the amplifying effect of Amino-6-mercaptopurine (AMP).

5 These results demonstrate a correlation between the production of recombination and of SV40 gene amplification.

B. Restriction of carcinogen-induced gene amplification by (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine (BVDU)

10 The results are summarized in Figures 4 to 7.

15 In experiments with yeasts (Figure 4), BVDU demonstrated an anti-recombinant and co-mutagenic action. This action was more obvious in the presence of low concentrations of liver microsomes (S9 mix) than in their absence, as well as being very much more pronounced. Metabolism of BVDU therefore enhances its anti-recombinant effect.

20 BVDU in clinically relevant doses produces a reduction in AMP-induced gene amplification. The effect starts at a dose of about 0.05 µg/ml and leads in dose-dependant fashion to complete blockade of AMP-induced gene amplification at a dose of 5 µg/ml (Figure 5).

An independent repeat experiment confirmed this result (Figure 6). Furthermore, BVDU alone seems to slightly reduce the degree of spontaneous amplification.

25 The addition of S9 mix also leads to a reduction in the AMP-induced gene amplification. This occurred, however, at a lower dose range than in the experiments without S9 mix. It seems that possible metabolism of the BVDU results in a further increase in the amplification-limiting effect (Figure 7). This would serve to further increase the relevance of the result.

30 In summary, it can be stated that BVDU restricts the gene amplification provoked by carcinogens. This raises the possibility of preventing the development of resistance to cytostatic agents by co-administration of BVDU with the cytostatic agent, as well as of reducing the degree of tumor malignancy.

35 C. Prevention of the development of "multi-drug resistance" (MDR) to cytostatic agents in human and animal tumor cells by simultaneous admission of BVDU.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

5 The human tumor cell line K562-WT (Fig. 8) and the mouse tumor cell line F46-WT (Fig. 9) (WT = Wild Type = sensitive to cytostatic agents = no gene amplification of the MDR gene) were treated with stepwise increasing concentrations of Adriamycin over the course of several weeks. In the course of this treatment, the cells acquired resistance to the treatment. Whereas 20 ng/ml doses of Adriamycin are strongly toxic to non-resistant cells after a treatment time of 4 days, the cells are completely immune to the effects of 20 ng/ml of Adriamycin after prolonged treatment with stepwise increasing doses of the agent (Figures 8 & 9). The development of resistance depends upon amplification of the MDR gene. This is demonstrated using Northern blotting, a technique to demonstrate RNA molecules, i.e. the transcription product of a gene, using the MDR gene as a probe (Fig. 10). Resistant cells show a band whereas non-resistant cells show no band (the situation at the beginning of the treatment).

15 In parallel experiments, Adriamycin is given together with either 0.5 or 1 µg/ml of BVDU (BVDU is only toxic to human tumor cell lines at concentrations above about 10 µg/ml and to mouse tumor cell lines above about 8 µg/ml (Figs. 8 & 9)). BVDU prevents the development of resistance to Adriamycin. The tumor cells remain sensitive to the cytostatic treatment and die. The action of BVDU is so strong that the treatment has to be interrupted by rest periods (growth without substances), so that the experiment stretches out over 6 to 8 weeks.

20 BVDU + Adriamycin treatment leads to a substantially weaker amplification of the MDR gene than Adriamycin treatment alone (Fig. 10). The effect of the BVDU treatment is in reality much greater than the attenuation of the band indicates. This is because at the end of the treatment, only those cells, which have developed at least some resistance to the Adriamycin treatment, survive. The cells, which remained non-resistant following the BVDU treatment, have already died off. The truly relevant effect, which cannot be demonstrated by the Northern blot technique, consists, therefore, in the dying-off of non-resistant cells, which is measured in the inactivation curves (Figs. 8 & 9).

30 Since the development of resistance to cytostatic agents in human tumors also depends upon the amplification of the MDR gene, it should be possible to perform cytostatic therapy at lower doses, and over a more prolonged period, than is currently possible by combining treatment using the desired cytostatic agent together with BVDU. In addition, the prevention of the development of resistance is also of great importance for other applications.

35 D. Prevention of the development of "multi-drug resistance" (MDR) to cytostatic agents in tumor cells by simultaneous administration of anti-recombinant 5-substituted nucleosides.

THIS PAGE BLANK

It can be seen from Figs. 11 & 12 that the anti-recombinant action is not specific only to BVDU, but is also a property of all 5-substituted nucleosides.

Fig. 11 shows the anti-recombinant effects of (E)-5-(2-bromovinyl)-2-deoxyuridine, (E)-5-(2-bromovinyl)-1- β -D-arabinofuranosyl-uracil and (E)-5-(2-bromovinyl)-2-deoxy-4-thiouridine in *Saccharomyces cerevisiae* MP1 and

Fig. 12 the anti-recombinant effects of 5-Iodo-2-deoxycytidine, 5-Iodo-2-deoxyuridine and 2-deoxy-5-trifluoromethyluridine in *Saccharomyces cerevisiae* MP1.

The F4-6-WT mouse tumor cell line (WT = Wild Type = sensitive to cytostatic agents = no gene amplification of the MDR gene) was treated over several weeks with stepwise increasing concentrations of Adriamycin. In the course of this treatment, the cells developed resistance to it. Whereas 20 ng/ml of Adriamycin are toxic to non-resistant cells after a treatment time of 4 days, after long-term treatment with stepwise increasing concentrations the cells became completely insensitive to 20 ng/ml of Adriamycin (Figs. 13 & 14). The development of resistance depends upon amplification of the MDR gene. This can be demonstrated with the Northern blot technique, a procedure which demonstrates the presence of RNA molecules, i.e. the products of gene transcription, when the MDR gene is used as the probe (Fig. 15). Resistant cells show a band, non resistant cells (the situation at the beginning of the treatment) show no band. The level of β -actin mRNA was also analyzed for comparison.

β -actin was used as an internal control for the amount of RNA.

In parallel experiments, Adriamycin was given together with 1 μ g/ml of various 5-substituted nucleosides. All six 5-substituted nucleosides prevent the development of resistance to Adriamycin. The tumor cells remain sensitive to the cytostatic agent and die off. The action of the 5-substituted nucleosides was so strong that the treatment had to be interrupted by rest periods (growth without substances), such that the experiment extended over 6 to 8 weeks.

Fig. 15 shows the Northern blot analysis of the RNA:

Expression of the MDR gene in the mouse F4-6-WT tumor cell line. The level of β -actin was also analyzed for comparison. β -actin was used as an internal control for the amount of RNA.

Positive	Adriamycin-resistant F4-6-WT cells
Negative	Adriamycin-sensitive F4-6-WT cells
1	1 μ g/ml (E)-5-(2-bromovinyl)-2-deoxyuridine + Adriamycin
2	1 μ g/ml (E)-5-(2-bromovinyl)-1- β -D-arabinofuranosyl-uracil + Adriamycin
3	1 μ g/ml (E)-5-(2-bromovinyl)-2-deoxy-4-thiouridine + Adriamycin

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- 4 1 µg/ml 5-Iodo-2'-deoxycytidine + Adriamycin
- 5 1 µg/ml 5-Iodo-2'-deoxyuridine + Adriamycin
- 6 1 µg/ml 2'-deoxy-5-trifluoromethyluridine + Adriamycin
- 7 1 µg/ml (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine (BVDU) + Adriamycin

5

5-substituted nucleoside + Adriamycin treatment leads to a markedly weaker amplification of the MDR gene than Adriamycin treatment alone (Figure 15). The effect of the treatment is in reality very much greater than the attenuation of the bands indicates. This is because, at the end of the treatment, only those cells which have developed at least some resistance to the Adriamycin treatment survive. Those cells which have remained non-resistant as a result of the BVDU treatment have already died off. The truly relevant effect, which cannot be demonstrated by the Northern blot technique, consists, therefore, in the dying-off of non-resistant cells, which is measured in the inactivation curves (Figs. 13 & 14).

15

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Claims of this Patent

1. The use of 5-substituted nucleosides in combination with at least one cytostatic agent to produce a pharmaceutical agent which prevents or reduces the development of resistance to treatment with cytostatic agents.
- 5 2. Use as in Claim 1, wherein (E)-5-(2-bromovinyl)-2-deoxyuridine (BVDU) and/or its metabolites is used as the nucleoside.
- 10 3. Use as in Claim 2, wherein (E)-5-(2-bromovinyl)-uracil (BVU) is used as the metabolite.
4. Use as in Claim 1, wherein (E)-5-(2-bromovinyl)-1- β -D-arabinofuranosyluracil and/or its metabolites is used as the nucleoside.
- 15 5. Use as in Claim 1, wherein (E)-5-(2-bromovinyl)-2-deoxy-4'-thiouridine (BVDU) and/or its metabolites is used as the nucleoside.
6. Use as in Claim 1, wherein 5-Iodo-2-deoxycytidine and/or its metabolites is used as the nucleoside.
- 20 7. Use as in Claim 1, wherein 5-Iodo-2-deoxyuridine and/or its metabolites is used as the nucleoside.
8. Use as in Claim 1, wherein 2-Deoxy-5-trifluoromethyluridine and/or its metabolites is used as the nucleoside.
- 25 9. Pharmaceutical agents containing 5-substituted nucleosides meeting at least one of the criteria in Claims 1 to 8, in an amount which results in a blood concentration of 0.02 $\mu\text{g/ml}$ to 10 $\mu\text{g/ml}$, at least one cytostatic agent and customary binding agents and catalysts.
- 30 10. Pharmaceutical agents as defined in Claim 9 wherein the nucleoside is present in an amount which produces a blood concentration in the range 0.05 $\mu\text{g/ml}$ to 5 $\mu\text{g/ml}$.
- 35 11. Pharmaceutical agents as defined in Claims 9 or 10 wherein the cytostatic agent(s) is(are) selected from the alkaloids, alkylating agents, antimetabolites, antibiotics or Cisplatin.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Figures

Fig. 1

Aceton	:	Acetone
Dimethylformid	:	Dimethylformide
DNA-Amplifikation	:	DNA amplification
Genotoxische Kanzerogene	:	Genotoxic carcinogens
Kontrolle	:	Control
Negativekontrolle	:	Negative control
Nicht-kanzerogene	:	Non-carcinogens
Positivkontrolle	:	Positive control
Relativer DNA-Gehalt	:	Relative DNA content
Zellen des chinesischen Hamsters	:	cells of the Chinese hamster

Fig. 2

Chrysarobin	:	Chrysarobine
Cumarin	:	Coumarin
DNA-Amplifikation	:	DNA amplification
Kontrolle	:	Control
Relativer DNA-Gehalt	:	Relative DNA content
Tumor Promotoren	:	Tumor promoters
Zellen des chinesischen Hamsters	:	cells of the Chinese hamster

Fig. 3

Acetamid	:	Acetamide
DNA-Amplifikation	:	DNA amplification
Kontrolle	:	Control
Nicht-genotoxische Kanzerogene	:	Non-genotoxic carcinogens
Ohne und mit	:	without and with
Relativer DNA-Gehalt	:	Relative DNA content
Testosterone	:	Testosterone
Thioacetamid	:	Thioacetamide
Zellen des chinesischen Hamsters	:	cells of the Chinese hamster

Fig. 4

Allein	:	alone
Ersatzblatt	:	substitute page
Genmutation	:	gene mutation
Mutanten	:	mutants
Nichtreziproke Rekombinationen	:	non-reciprocal recombinations
Oder	:	or
Regel	:	rule
Reziproke Rekombinationen	:	reciprocal recombinations

Fig. 5

Ersatzblatt	:	substitute page
Kontrolle	:	control
Regel	:	rule
Relativer DNA-Gehalt	:	Relative DNA content

Fig. 6

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Allein	:	alone
Ersatzblatt	:	substitute page
Kontrolle	:	control
Regel	:	rule
Relativer DNA-Gehalt	:	Relative DNA content

Fig. 7

Ersatzblatt	:	substitute page
Kontrolle	:	control
Regel	:	rule
Relativer DNA-Gehalt	:	Relative DNA content

Fig. 8

Allein	:	alone
Anzahl	:	number of
Ersatzblatt	:	substitute page
Für 4 Tage	:	for 4 days
Menschlicher	:	human
Regel	:	rule
Wochen Adriamycin	:	weeks of Adriamycin
Zellen	:	cells

Fig. 9

Allein	:	alone
Anzahl	:	number of
Ersatzblatt	:	substitute page
Für 4 Tage	:	for 4 days
Maus	:	mouse
Regel	:	rule
Wochen Adriamycin	:	weeks of Adriamycin
Zellen	:	cells

Fig. 10

Actin-Gen	:	actin gene
Adriamycin allein	:	Adriamycin alone
Als Sonde diente das	:	using as the probe the
Amplifikation	:	amplification
Begin der Behandlung	:	Start of treatment
Der	:	of the
Des	:	of the
Ende der Behandlung mit	:	End of the treatment with
Gens	:	gene
Kontrolle	:	Control
Nachweis	:	proof
MDR-Gen	:	MDR gene
Mit Hilfe des Northern Technik	:	using the Northern blot technique
Zellen	:	cells

Fig. 11

Allein	:	alone
Ersatzblatt	:	substitute page
Nichtreziproke Rekombinationen	:	non-reciprocal recombinations
Regel	:	rule

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig. 12

Allein	:	alone
Ersatzblatt	:	substitute page
Nichtreziproke Rekombinationen	:	non-reciprocal recombinations
Regel	:	rule

Fig. 13

Allein	:	alone
Anzahl	:	Number of
Ersatzblatt	:	substitute page
Regel	:	rule
Tumorzellen	:	tumor cells
Wochen	:	weeks

Fig. 14

Allein	:	alone
Anzahl	:	Number of
Ersatzblatt	:	substitute page
Regel	:	rule
Tumorzellen	:	tumor cells
Wochen	:	weeks

Fig. 15

Aktin	:	Actin
Ersatzblatt	:	substitute page
Regel	:	rule

THIS PAGE BLANK (SPTO)

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation: A61K 31/70	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/23506 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 8. August 1996 (08.08.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/00169 (22) Internationales Anmeldedatum: 31. Januar 1996 (31.01.96) (30) Prioritätsdaten: 195 03 152.0 1. Februar 1995 (01.02.95) DE 195 45 892.3 8. December 1995 (08.12.95) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leonrodstrasse 54, D-80636 München (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FAHRIG, Rudolf [DE/DE]; Fritz-Goy-Weg 3, D-30657 Hannover (DE). STEINKAMP- ZUCHT, Angela [DE/DE]; Roonstrasse 3, D-30161 Han- nover (DE). (74) Anwalt: BUTENSCHÖN, BERGMANN, NÖTH, REIT- ZLE, GRAMBOW, KRAUS; Mozartstrasse 17, D-80336 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: BR, JP, KR, MX, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen</i> <i>Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen</i> <i>eintreffen.</i>
(54) Title: USE OF 5'SUBSTITUTED NUCLEOSIDES TO PROVIDE RESISTANCE IN CYTOSTATIC TREATMENT AND MEDICA- MENTS CONTAINING SAID NUCLEOSIDES (54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON 5' SUBSTITUIERTEN NUKLEOSIDEN ZUR HEMMUNG VON RESISTENZBILDUNG BEI DER ZYTOSTATIKABEHANDLUNG UND ARZNEIMITTEL, ENTHALTEND DIESE NUKLEOSIDE (57) Abstract <p>The invention relates to the use of 5'substituted nucleosides in combination with at least one cytostatic in the production of a medicament to prevent or reduce the build-up of resistance in cytostatic treatment and a medicament containing BVDU and/or its metabolites.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft die Verwendung von 5'-substituierten Nukleosiden in Kombination mit mindestens einem Zytostatikum zur Herstellung eines Arzneimittels zur Verhinderung bzw. Reduktion der Resistenzbildung bei der Zytostatikabehandlung sowie ein Arzneimittel, enthaltend BVDU und/oder seine Metaboliten.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

VERWENDUNG VON 5' SUBSTITUIERTEN NUKLEOSIDEN ZUR HEMMUNG VON RESISTENZBILDUNG BEI DER ZYTOSTATIKABEHANDLUNG UND ARZNEIMITTEL, ENTHALTEND DIESE NUKLEOSIDE

5

Das Auftreten von "Arzneimittel-Resistenz" ist der Hauptgrund für Fehlschläge in der Krebs-Chemotherapie. Tumoren, welche anfangs empfindlich auf Zytostatika reagieren, erholen sich sehr häufig nach einer gewissen Behandlungszeit und sind dann resistent gegenüber der Wirkung verschiedenartiger antineoplastischer Arzneimittel. Obwohl das Problem der "Arzneimittel-Resistenz" schon seit 1948, dem Beginn der Krebstherapie mit Zytostatika, bekannt ist, wurde bis heute kein Weg gefunden, die Resistenzbildung zu verhindern. Charakteristisch für alle bisher untersuchten hochresistenten Tumoren und Zelllinien ist die Amplifikation (Vervielfachung) einer kleinen Gruppe von Genen. Als Folge dieser DNA- oder Genamplifikation kann eine erhöhte Expression dieser Gene nach-

- gewiesen werden, welche zur Resistenz gegenüber dem Arzneimittel führt. Als Folge dieser DNA-Amplifikation kann eine erhöhte Expression verschiedener Gene nachgewiesen werden. Schutzproteine, die zur Ausschleusung von Giftstoffen aus der Zelle dienen, können so vermehrt gebildet werden (P-Glycoprotein). Dieser Effekt wird auch als "multi-drug-resistance" (MDR) bezeichnet.
- 10 Zusätzlich zur MDR korreliert der Amplifikationsgrad gewisser Gene, vor allem gewisser Onkogene, mit dem Grad der Malignität. So sind die Überlebenschancen bei einer Amplifikation von ERVV2, RASKI, INT3, HST1, MYC und KSRAM beim Magenkrebs (Hirohasi, S., and Sugimura, T. Genetic alterations in human gastric cancer. Cancer cells (Cold Spring Harbor), 3:49-52, 1991) und ERBB2 und MYC beim Ovarkarzinom (Sasano, H., Garrett, C.T., Wilkinson, D.S., Silverberg, S., Comerford, J., and Hyde, J. Protooncogene amplification and tumor ploidy in human ovarian neoplasm. Hum.Pathol., 21:382-391,1990) sehr schlecht. Beim Brustkrebs korreliert die Amplifikation von MYC (Borg, A., Baldetorp, B., Fernö, M., Olsson, H., and Sigurdsson, H. C-myc amplification is an independent prognostic factor in postmenopausal breast cancer. Int. J. Cancer, 51:687-691,1992) und Co-Amplifikation von INT2 und HST1 (Borg, A., Sigurdsson, H., Clark, G..M., et al., Association of INT2/HST1 coamplification in primary breast cancer with hormone-dependent phenotype and poor prognosis. Br.J.Cancer, 63:136-142, 1991) mit dem Krankheitsverlauf. Die Amplifikation von ERBB2 (Descotes, F., Pavy, J.-J., and Adessi, G.L. Human breast cancer: Correlation study between HER-2/neu amplification and prognostic factors in an unselected population. Anticancer Res.,

13:119-124,1993) und EGFR (Klijn, J.G.M., Berns, P.M.J.J., Schmitz, P.I.M., and Foekens, J.A. The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. Endocr.Rev., 13:3-17,1992) ist mit einem schlechten Krankheitsverlauf verbunden. Beim Ösophaguskarzinom korreliert die Co-Amplifikation von HST1 und INT2 mit dem Grad der Metastasierung (Tsuda, T., Tahara, E., Kajiyama, G., Sakamoto, H., Terada, M., and Sugimura, T. High incidence of coamplification of hst-1 and int-2 genes in human esophageal carcinomas. Cancer Res. 49:5505-5508,1989).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß durch chronische Behandlung mit kanzerogenen Zytostatika induzierte Genamplifikation nicht nur zur Resistenz gegenüber dieser Behandlung führt, sondern auch zur Überexpression gewisser Onkogene, welche den Grad der Malignität kontrollieren.

Es sind eine Reihe von Substanzen beschrieben worden, die der erworbenen Arzneimittelresistenz entgegenwirken. Hierzu gehören die von Kennedy (Kennedy, A.R., Prevention of Carcinogenesis by Protease Inhibitors, Cancer Res., 54:1999-2005,1994) beschriebenen Arbeiten über die anti-kanzerogenen Wirkungen von Protease-Inhibitoren. Diese können kanzerogeninduzierte Genamplifikation auf nahezu normale Level herunterdrücken. Kennedy beobachtete, daß strahleninduzierte Genamplifikation in gleicher Weise unterdrückt wird, wie es ihrer Fähigkeit entspricht, strahleninduzierte Transformation zu unterdrücken, so daß auf einen Zusammenhang zwischen beiden Prozessen geschlossen wird. Darüber hinaus wirken Protease-Inhibitoren als Antagonisten von (co-rekombinogenen) Tumor-Promotoren

bei Auslösung von Transformation in vitro. Protease-Inhibitoren werden auch als wirkungsvolle Anti-Promotoren in In-vivo-Untersuchungen beschrieben (Troll, W., Klassen, A., and Janoff, A. Tumorigenesis in mouse skin: inhibition by synthetic inhibitors of proteases. Science (Washington DC) 169:1211-1213, 1970).

Aus der Literaturstelle Moscow, I.A., and Cowan, K.H. Multidrug resistance. J.Natl.Cancer Inst. 80: 14-20, 1988, ist bekannt, daß Verapamil der MDR entgegenwirkt. Dieser "calcium channel blocker" erhöht die Zytotoxizität durch Erhöhung der intrazellulären Akkumulation von Arzneimitteln. Wahrscheinlich geschieht dies durch eine Wirkung auf das P-Glykoprotein oder andere Transportproteine. Die Toxizität dieser und ähnlicher Substanzen, wie z.B. Quinidin, steht ihrem klinischen Einsatz im Wege.

Ausgehend hiervon, ist es die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine wirksame Substanz zur Verhinderung bzw. Reduzierung der Resistenzbildung gegenüber der Zytostatikabehandlung anzugeben und ein entsprechendes Arzneimittel vorzuschlagen.

Die Aufgabe in bezug auf die Substanz wird durch die kennzeichnenden Merkmale des Anspruches 1 gelöst, in bezug auf das Arzneimittel durch die Merkmale des Anspruches 9.

Erfindungsgemäß wird somit vorgeschlagen, die Resistenzbildung durch gleichzeitige Gabe von 5' substituierten Nukleosiden und einem Zytostatikum zu verhindern bzw. zu reduzieren. Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß 5' Nukleoside die Entstehung

von kanzerogeninduzierten Genamplifikationen verhindert oder zumindest abschwächt. Dadurch wird die Möglichkeit eröffnet, durch gleichzeitige Gabe dieser Nukleoside mit einem Zytostatikum die Entstehung von Resistenzen gegenüber diesem Arzneimittel zu verhindern und auch den Grad der Malignität zu beeinflussen.

Als Beispiel für 5'-Nukleoside sind zu nennen: 5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridin (BVDU), (E)-5-(2-bromovinyl)-1- β -D-arabinofuranosyluracil, (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxy-4'-thiouridin. Abb. 2: 5-Jodo-2'-dexycytidin, 5-Jodo-2'-deoxyuridin, 2'-Deoxy-5-trifluoromethyluridin, besonders bevorzugt ist BVDU und (E)-5-(2-Bromovinyl-)uracyl (BVU).

Die Erfindung betrifft weiterhin Arzneimittel zur Verhinderung der Resistenzenbildung gegenüber Zytostatikabehandlung, die 5' Nukleoside enthalten. Die 5' Nukleoside sind dabei in der Formulierung des Arzneimittels in einer Menge enthalten, aus der eine Konzentration von 0,02 $\mu\text{g/ml}$ bis 10 $\mu\text{g/ml}$ im Blut resultiert. In Versuchen konnte gezeigt werden, daß der optimale Bereich bei 0,05 $\mu\text{g/ml}$ bis 5 $\mu\text{g/ml}$ liegt.

Die Zytostatika können dabei in den üblichen bisher bekannten Mengen in der Formulierung enthalten sein (Oshiro, Y., Piper, C.E., Balwierz, P.S., and Garriot, M.L. (1992) Genotoxic properties of (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine (BVDU). Fundamental and Applied Toxicology, 18, 491-498). Beispiele für Zytostatika sind Cyclophosphamid und andere Alkylantien, Antimetabolite wie Methotrexat, Alkaloide wie Vinblastin, Antibiotika wie Bleomycin, Cisplatin so-

wie andere Stoffe. Weitere Beispiele für Zytostatika sind aus "Rote Liste 1995", Editio Cantor Verlag für Medizin und Naturwissenschaften, Aulendorf/Württ., 1995, zu entnehmen.

5

Die Träger-, Zusatz- und Hilfsstoffe entsprechen denen, wie sie bisher aus dem Stand der Technik bekannt sind. Das Arzneimittel selbst kann dabei in fester oder flüssiger Form oder auch als Spray vorliegen.

10

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Modellversuchen näher erläutert.

A. Modellsubstanzen

15

Für die Untersuchung von Amplifikationsphänomenen dient eine Hamsterzelllinie, die ein Virus (Simian Virus 40) im Genom integriert enthält. Bekannt ist für diese Zelllinie, daß eine Zugabe genotoxischer Substanzen, aber auch verschiedener "nichtgenotoxischer" Kanzerogene und Tumor-Promotoren zur Amplifikation von SV40-DNA im Hamstergenom führt. Die Methode beruht darauf, daß als Sonde dienende markierte SV40-DNA mit Hamsterzell-DNA, die SV40-DNA in amplifizierter Kopienzahl enthält, hybridisiert wird. Die Menge gebundener Sonde gibt Aufschluß über den Amplifikationsgrad der integrierten Virus-DNA.

20

25

30

Zur Bestimmung des Amplifikationsgrades wird gleichzeitig mit der SV40-DNA die Albumin-Gen-DNA gemessen. Das Albumin-Gen wird nämlich im Gegensatz zur SV40-DNA in der Zelle nicht amplifiziert. Der Wert des relativen SV40-DNA-Gehalts ergibt sich demnach aus

dem Quotienten des Signals der mit SV40-DNA hybridisierten DNA-Sonde zu dem Signal der mit Albumin-Gen hybridisierten DNA-Sonde aus denselben SV40-transformierten embryonalen CO631-Hamsterzellen.

5

Als Modellsubstanzen dienten:

1. Mutagene und rekombinogene genotoxische Kanzerogene (Positiv-Kontrolle)
10 Triethylenmelamin (TEM)
 4-Nitrochinolin 1-Oxid (4-NQO)
2. Nicht-Kanzerogene (Negativ-Kontrolle), welche
15 weder Mutationen noch Rekombinationen induzieren
 Aceton
 Dimethylformamid
3. Co-rekombinogene Tumor-Promotoren
 Mezerein
20 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat (TPA)
 Chrysarobin
 Coumarin
4. Rekombinogene nicht-genotoxische Kanzerogene mit
25 unbekanntem Wirkmechanismus
 Thioacetamid
 Acetamid
5. Testosteron nach Metabolisierung durch Rattenlebermikrosomen (S9-Mix) sowie ohne S9-Mix
30 Testosteron wirkt
 mit S9-Mix anti-rekombinogen und
 ohne S9-Mix co-rekombinogen

Die Wirkung der obengenannten Modellsubstanzen allein oder in Kombination mit einem Kanzerogen wurde im Genamplifikations-System untersucht.

5 Die Ergebnisse mit den Modellsubstanzen sind in den Figuren 1 bis 3 zusammengefaßt.

Die Nicht-Kanzerogene Aceton und Dimethylformamid zeigen keine Wirkung.

10

Alle anderen Substanzen, die nicht-genotoxischen Kanzerogene mit unbekanntem Wirkmechanismus, Thioacetamid und Acetamid, die genotoxischen Kanzerogene TEM und 4-NQO sowie die Tumor-Promotoren Mezerein, 15 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat (TPA), Chrysarobin und Coumarin, für sich allein gegeben, erhöhen die SV40-Genamplifikation.

20

Teststeron erniedrigt mit S9-Mix die amplifizierend Wirkung von Methotrexate (MTX), ohne S9-Mix erhöht es die amplifizierende Wirkung von Amino-6-mercaptopurin (AMP).

25

Diese Ergebnisse zeigen eine Übereinstimmung zwischen der Auslösung von Rekombination und SV40-Genamplifikation.

30

B. Hemmung kanzerogeninduzierter Genamplifikation durch (E)-5-(2-Bromovinyl)-2'-deoxyuridine (BVDU)

Die Ergebnisse sind in den Figuren 4 bis 7 zusammengefaßt.

5 BVDU hatte im Versuch mit Hefen (Figur 4) eine anti-rekombinogene und co-mutagene Wirkung gezeigt. Diese Wirkung war in Gegenwart von Lebermikrosomen (S9-Mix) in niedrigeren Konzentrationen sichtbar als in Abwesenheit von S9-Mix und auch sehr viel ausgeprägter. Eine Metabolisierung von BVDU verstärkt also den antirekombinogenen Effekt.

10 BDVU zeigt in klinisch relevanten Dosen eine Hemmung AMP-induzierter Genamplifikation. Der Effekt setzt bei etwa 0,05 µg/ml ein und führt dosisabhängig bei 5 µg/ml zu einer vollständigen Hemmung der AMP-induzierten Genamplifikation (Figur 5).

15 Der unabhängige Wiederholungsversuch bestätigt das Ergebnis (Figur 6). Darüber hinaus scheint BVDU allein den spontanen Amplifikationsgrad leicht zu erniedrigen.

20 Zugabe von S9-Mix zeigt ebenfalls eine Erniedrigung AMP-induzierter Genamplifikation. Dieser erfolgt allerdings in einem niedrigeren Dosisbereich als in den Versuchen ohne S9-Mix. Eine mögliche Metabolisierung von BVDU scheint den amplifikationshemmenden Effekt
25 also noch zu verstärken (Figur 7). Dies würde die Relevanz der Ergebnisse noch verstärken.

30 Zusammenfassend kann gesagt werden, daß BVDU kanzerogeninduzierte Genamplifikation hemmt. Dies eröffnet die Möglichkeit, durch gleichzeitige Gabe von BVDU mit einem Zytostatikum die Entstehung von Resistenzen gegenüber diesem Arzneimittel zu verhindern und die Malignität zu erniedrigen.

C. Verhinderung der Bildung von "Multi-Drug-Resistance" (MDR) in menschlichen und tierischen Tumorzellen gegenüber Zytostatikabehandlung durch gleichzeitige Gabe von BVDU

5 Die menschliche Tumorzelllinie K562-WT (Fig. 8) und die Tumorzelllinie F46-WT der Maus (Fig. 9) (WT = Wildtyp = empfindlich gegenüber Zytostatikabehandlung = keine Amplifikation des MDR-Gens) wurde über mehrere
10 re Wochen mit stufenweise steigenden Konzentrationen von Adriamycin behandelt. Im Laufe der Behandlung erwarben die Zellen eine Resistenz gegenüber dieser Behandlung. Wirken gegenüber nichtresistenten Zellen 20 ng/ml Adriamycin bei einer Behandlungszeit von
15 4 Tagen stark toxisch, so sind die Zellen nach Langzeitbehandlung mit stufenweise steigenden Konzentrationen gegenüber 20 ng/ml Adriamycin völlig unempfindlich geworden (Figuren 8 und 9). Die Resistenzbildung beruht auf der Amplifikation des MDR-Gens.
20 Nachgewiesen wird dies mit Hilfe der Northern-Technik, eines Verfahrens zum Nachweis von RNA-Molekülen, also der Transkription eines Gens, unter Einsatz des MDR-Gens als Sonde (Figur 10). Resistente Zellen zeigen eine Bande, nichtresistente Zellen (Zustand am
25 Beginn der Behandlung) zeigen keine Bande.

In Parallelversuchen wird Adriamycin mit entweder 0,5 oder 1 µg/ml BVDU zusammen gegeben (BVDU wirkt in
30 menschlichen Tumorzellen erst ab etwa 10 µg/ml toxisch, in Zellen der Maus ab etwa 8 µg/ml (Figuren 8 und 9). BVDU verhindert die Resistenzbildung gegenüber Adriamycin. Die Tumorzellen bleiben empfindlich gegenüber der Zytostatikabehandlung und sterben ab. Die Wirkung des BVDU ist so stark, daß die Behandlung
35

durch Ruhepausen (Wachstum ohne Substanzen) unterbrochen werden muß, sich der Versuch also über 6 bis 8 Wochen erstreckt.

5 BVDU + Adriamycin-Behandlung führt zu einer wesentlich schwächeren Amplifikation des MDR-Gens als Adriamycin-Behandlung allein (Figur 10). Der Effekt der BVDU-Behandlung ist in Wirklichkeit noch sehr viel größer, als die Abschwächung der Bande ausdrückt. Am
10 Ende der Behandlung bleiben nämlich nur Zellen übrig, die wenigstens eine gewisse Resistenz gegenüber der Adriamycin-Behandlung erworben haben. Die infolge der BVDU-Behandlung nichtresistent gebliebenen Zellen sind bereits vorher abgestorben. Der eigentlich rele-
15 vante und mit Hilfe der Northern-Technik nicht faßbare Effekt besteht deshalb im Absterben der nicht-resistenten Zellen, welche in den Inaktivierungskurven (Figuren 8 und 9) gemessen wird.

20 Da die Resistenzbildung gegenüber Zytostatikabehandlung in menschlichen Tumoren ebenfalls auf der Amplifikation des MDR-Gens beruht, ist durch die Kombination von BVDU mit einem beliebigen Zytostatikum die Möglichkeit geboten, die Therapie in niedrigen Dosen
25 und über längere Zeiträume als bisher durchzuführen. Im übrigen ist die Verhinderung der Resistenzbildung auch für andere Anwendungen von großer Bedeutung.

30 D. Verhinderung der Bildung von "Multi-Drug-Resistance" (MDR) in Tumorzellen gegenüber Zytostatikabehandlung durch gleichzeitige Gabe von anti-rekombinogenen 5'-substituierten Nukleosiden

35 In den Figuren 11 und 12 ist zu sehen, daß die anti-rekombinogene Wirkung nicht nur spezifisch für BVDU

gilt, sondern eine Eigenschaft aller 5'-substituier-
ten Nukleoside ist.

5 Fig. 11 zeigt dabei die anti-rekombinogenen Effekte
von (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridin, (E)-5-(2-
bromovinyl)-1- β -D-arabinofuranosyl-uracil und (E)-5-
(2-bromovinyl)-2'-deoxy-4'-thiouridin in *Saccharomy-
ces cerevisiae* MP1, und

10 Fig. 12 die anti-rekombinogenen Effekte von 5-Jodo-
2'-deoxycytidin, 5-Jodo-2'-deoxyuridin und 2'-Deoxy-
5-trifluoromethyluridin in *Saccharomyces cerevisiae*
MP1.

15 Die Tumorzelllinie F4-6-WT der Maus (WT = Wildtyp =
empfindlich gegenüber Zytostatikabehandlung = keine
Amplifikation des MDR-Gens) wurde über mehrere Wochen
mit stufenweise steigenden Konzentrationen von Adria-
mycin behandelt. Im Laufe der Behandlung erwarben die
20 Zellen eine Resistenz gegenüber dieser Behandlung.
Wirken gegenüber nichtresistenten Zellen 20 ng/ml
Adriamycin bei einer Behandlungszeit von 4 Tagen
stark toxisch, so sind die Zellen nach Langzeitbe-
handlung mit stufenweise steigenden Konzentrationen
25 gegenüber 20 ng/ml Adriamycin völlig unempfindlich
geworden (Figur 13 und 14). Die Resistenzbildung be-
ruht auf der Amplifikation des MDR-Gens. Nachgewiesen
wurde dies mit Hilfe der Northern-Technik, eines Ver-
fahrens zum Nachweis von RNA-Molekülen, also der
30 Transkription eines Gens, unter Einsatz des MDR-Gens
als Sonde (Figur 15). Resistente Zellen zeigen eine
Bande, nichtresistente Zellen (Zustand am Beginn der
Behandlung) zeigen keine Bande. Die Level von β -Actin
mRNA wurden vergleichsweise ebenfalls analysiert.

β -Actin wurde als interne Kontrolle für die RNA-Menge benutzt.

In Parallelversuchen wurde Adriamycin mit 1 μ g/ml je eines 5'-substituierten Nukleosids zusammen gegeben. Alle sechs 5'-substituierten Nukleoside verhindern die Resistenzbildung gegenüber Adriamycin. Die Tumorzellen bleiben empfindlich gegenüber der Zytostatikabehandlung und sterben ab. Die Wirkung der 5'-substituierten Nukleoside war so stark, daß die Behandlung durch Ruhepausen (Wachstum ohne Substanzen) unterbrochen werden mußte, sich der Versuch also über 6 bis 8 Wochen erstreckte.

Figur 15 zeigt die Northern Blot Analyse der RNA: Expression der MDR-Gene in der Tumorzelllinie F4-6-WT der Maus. Die Level von β -Actin mRNA wurden vergleichsweise ebenfalls analysiert. β -Actin wurde als interne Kontrolle für die RNA-Menge benutzt.

pos. Adriamycin-resistente F4-6-WT Zellen

neg. Adriamycin-empfindliche F4-6-WT Zellen

1 1 μ g/ml (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridin + Adriamycin

2 1 μ g/ml (E)-5-(2-bromovinyl-1- β -D-arabinofuranosyl-uracil + Adriamycin

3 1 μ g/ml (e)-5-(2-bromovinyl-2'-deoxy-4'-thiouridin + Adriamycin

4 1 μ g/ml 5-Jodo-2'-deoxycytidin + Adriamycin

5 1 μ g/ml 5-Jodo-2'-deoxyuridin + Adriamycin

6 1 mg/ml 2'-Deoxy-5-trifluoromethyluridin + Adriamycin

7 1 μ g/ml (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine (BVDU) + Adriamycin

5'-substituiertes Nukl osid + Adriamycin-Behandlung führt zu einer wesentlich schwächeren Amplifikation des MDR-Gens als Adriamycin-Behandlung allein (Figur 15). Der Effekt der Behandlung ist in Wirklichkeit noch sehr viel größer als es die Abschwächung der Bande ausdrückt. Am Ende der Behandlung bleiben nämlich nur Zellen übrig, die wenigstens eine gewisse Resistenz gegenüber der Adriamycin-Behandlung erworben haben. Die infolge der BVDU-Behandlung nichtresistent gebliebenen Zellen sind ja bereits vorher abgestorben. Der eigentlich relevante und mit Hilfe der Northern-Technik nicht faßbare Effekt besteht deshalb im Absterben der nichtresistenten Zellen, welcher in den Inaktivierungskurven (Figur 13 und 14) gemessen wurde.

Patentansprüche

- 5 1. Verwendung von 5'-substituierten Nukleosiden in
Kombination mit mindestens einem Zytostatikum
zur Herstellung eines Arzneimittels zur Verhin-
derung bzw. Reduzierung der Resistenzenbildung
bei der Zytostatikabehandlung.
- 10 2. Verwendung nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß als Nukleosid
(E)-5-(2-Bromovinyl-)-2'-deoxyuridin (BVDU)
und/oder seine Metaboliten verwendet werden.
- 15 3. Verwendung nach Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet, daß als Metabolit (E)-5-
(2-Bromovinyl-)-uracyl (BVU) verwendet wird.
- 20 4. Verwendung nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß als Nukleosid (E)-5-
(2-bromovinyl)-1-β-D-arabinofuranosyluracil
und/oder seine Metaboliten verwendet werden.
- 25 5. Verwendung nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß als Nukleosid (E)-5-
(2-bromovinyl)-2'-deoxy-4'-thiouridin und/oder
seine Metaboliten verwendet werden.
- 30 6. Verwendung nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß als Nukleosid 5-Jo-
do-2'-deoxycytidin und/oder seine Metaboliten
verwendet werden.

35

- 5
7. Verwendung nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß als Nukleosid 5-Jo-
do-2'-deoxyuridin und/oder seine Metaboliten
verwendet werden.
- 10
8. Verwendung nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß als Nukleosid 2'-
Deoxy-5-trifluoromethyluridin und/oder seine
Metaboliten verwendet werden.
- 15
9. Arzneimittel, enthaltend 5'-substituierte Nu-
kleoside, nach mindestens einem der Ansprüche 1
bis 8, in einer Menge, aus der eine Konzentra-
tion von 0,02 µg/ml bis 10 µg/ml im Blut resul-
tiert, mindestens ein Zytostatikum und übliche
Träger- und Hilfsstoffe.
- 20
10. Arzneimittel nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleoside in
einer Menge enthalten sind, aus der eine Konzen-
tration von 0,05 µg/ml bis 5 µg/ml im Blut re-
sultiert.
- 25
11. Arzneimittel nach Anspruch 9 oder 10,
dadurch gekennzeichnet, daß die Zytostatika aus-
gewählt sind aus Alkaloiden, Alkylantien, Anti-
metaboliten, Antibiotika oder Cisplatin.

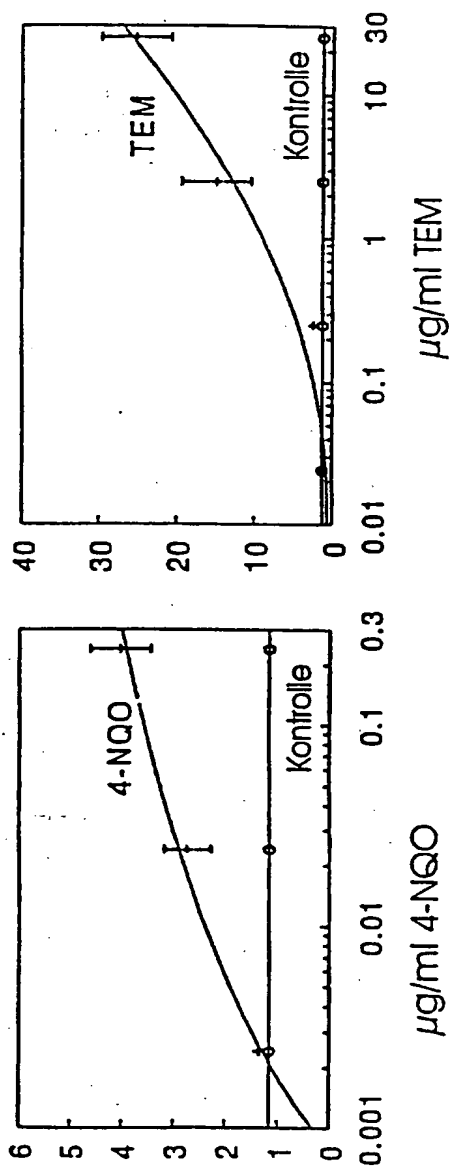
1/15

FIG. 1

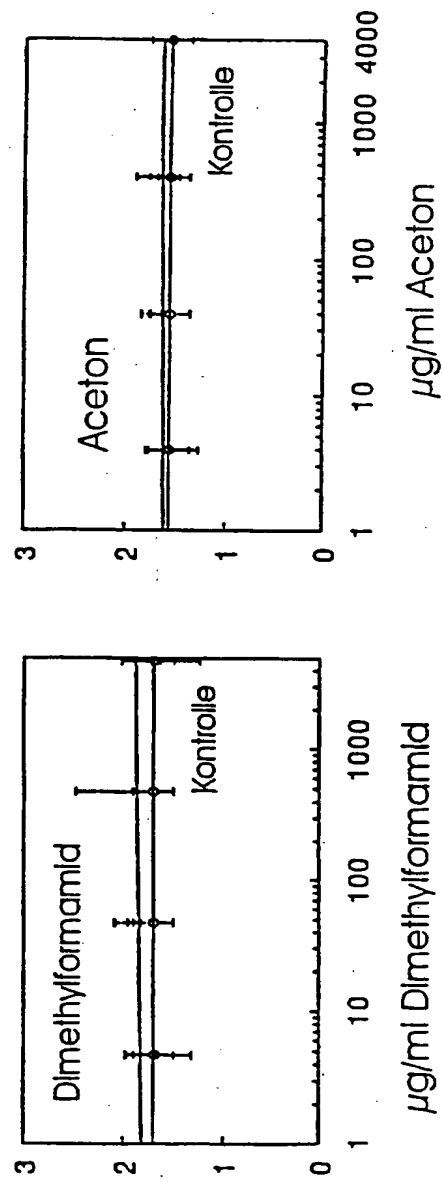
RELATIVER DNA-GEHALT

DNA-Amplifikation in Zellen des Chinesischen Hamsters

Positivkontrolle: Genotoxische Kanzerogene



Negativkontrolle: Nicht-Kanzerogene



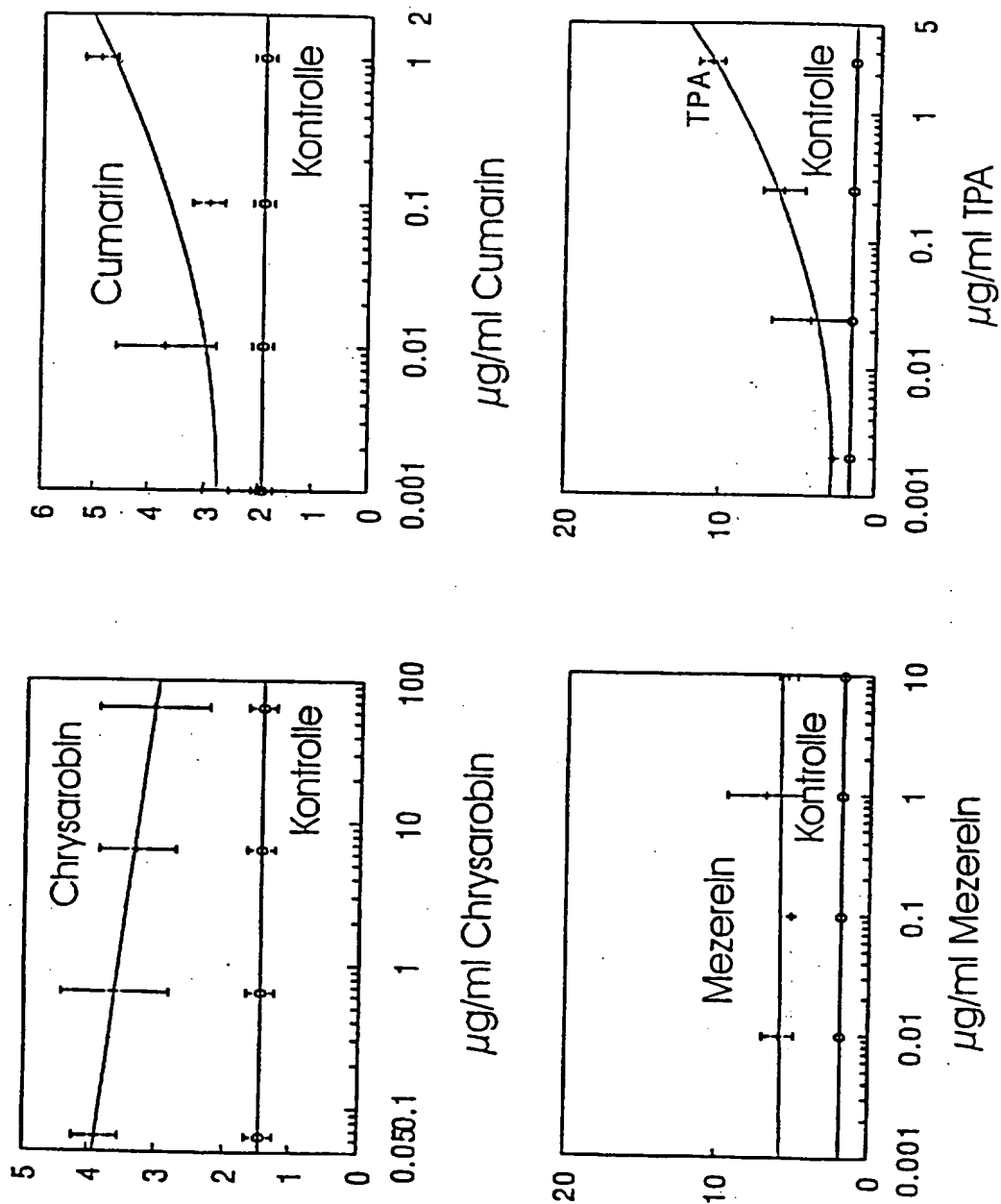
2/15

FIG. 2

RELATIVER DNA-GEHALT

DNA-Amplifikation in Zellen des Chinesischen Hamsters

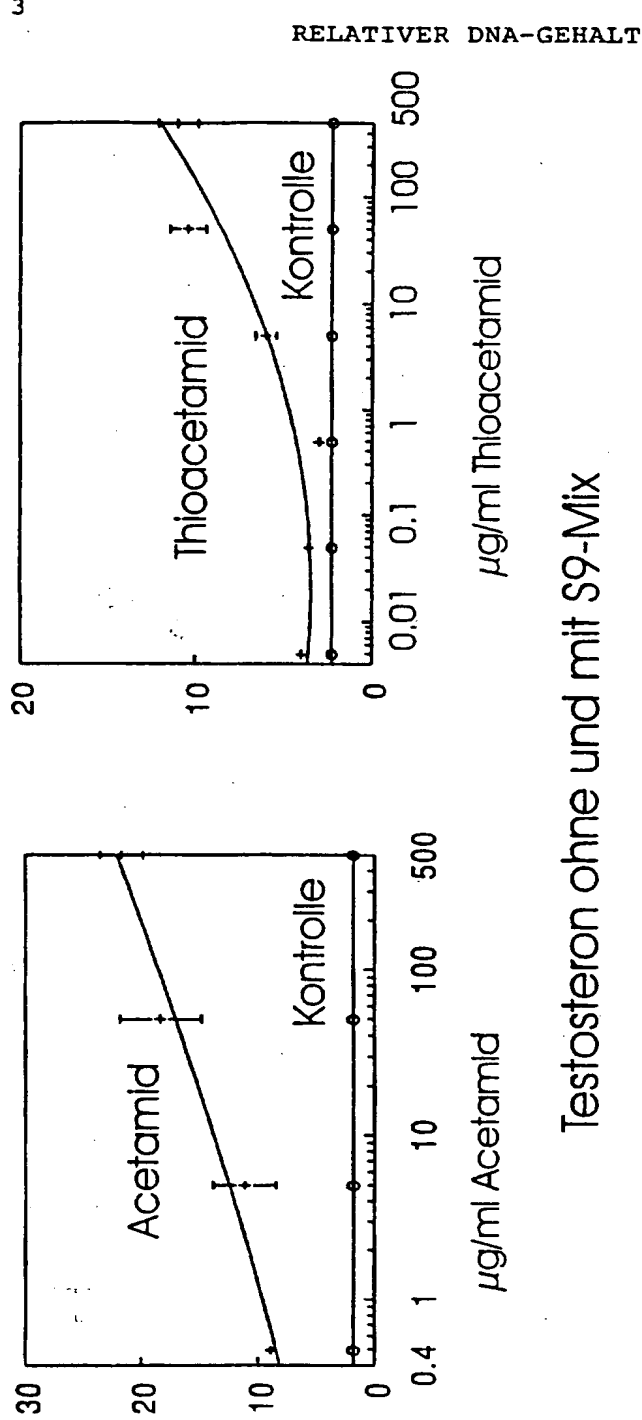
Tumor Promotoren



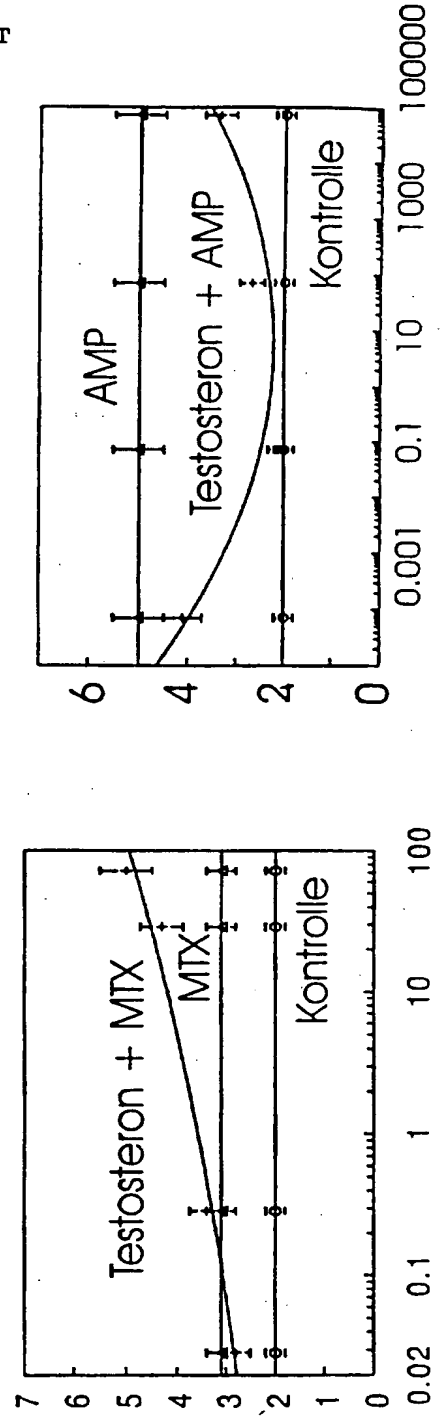
DNA-Amplifikation in Zellen des Chinesischen Hamsters

FIG. 3

Nicht-Genotoxische Kanzerogene

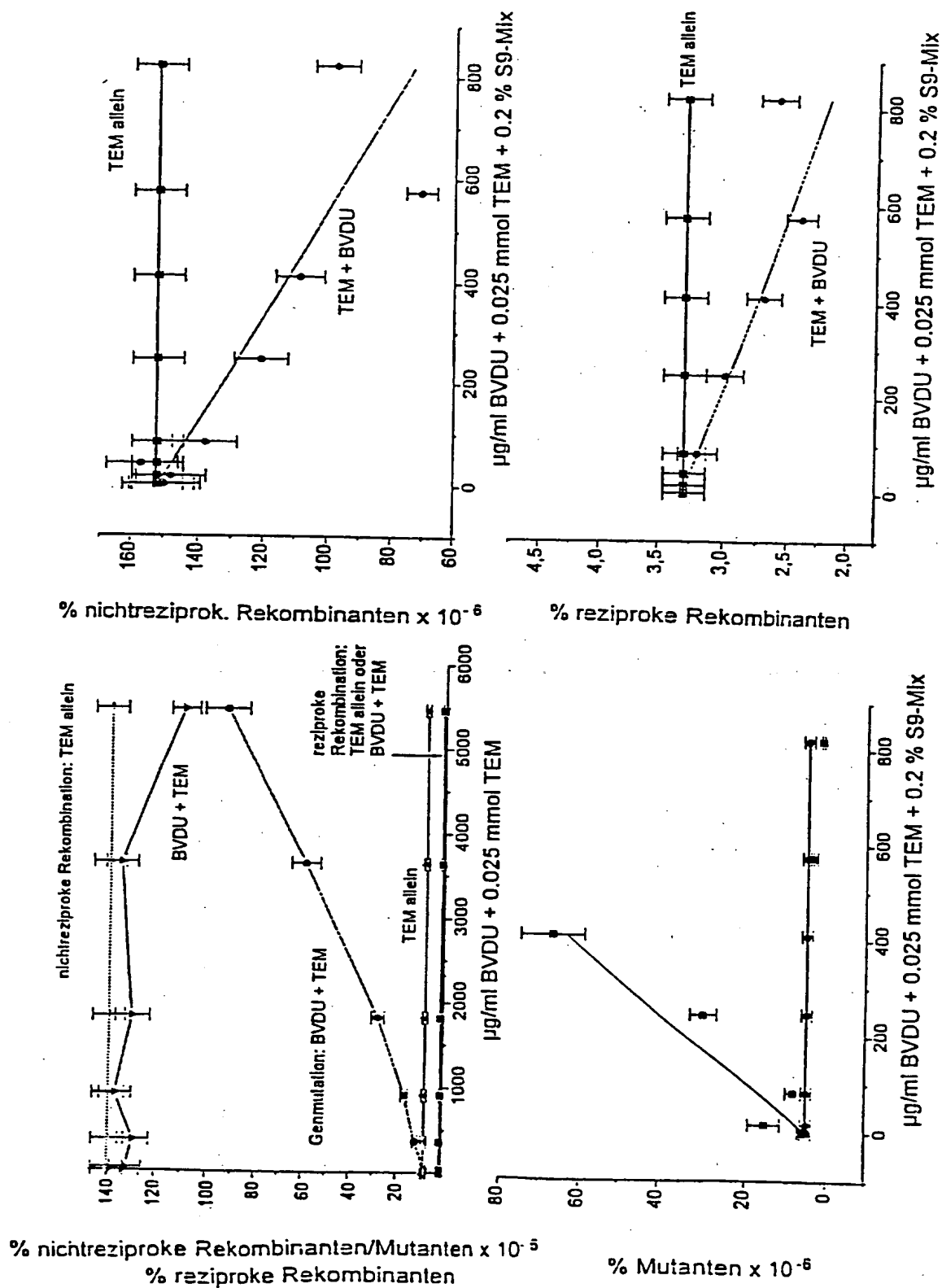


Testosteron ohne und mit S9-Mix



4/15

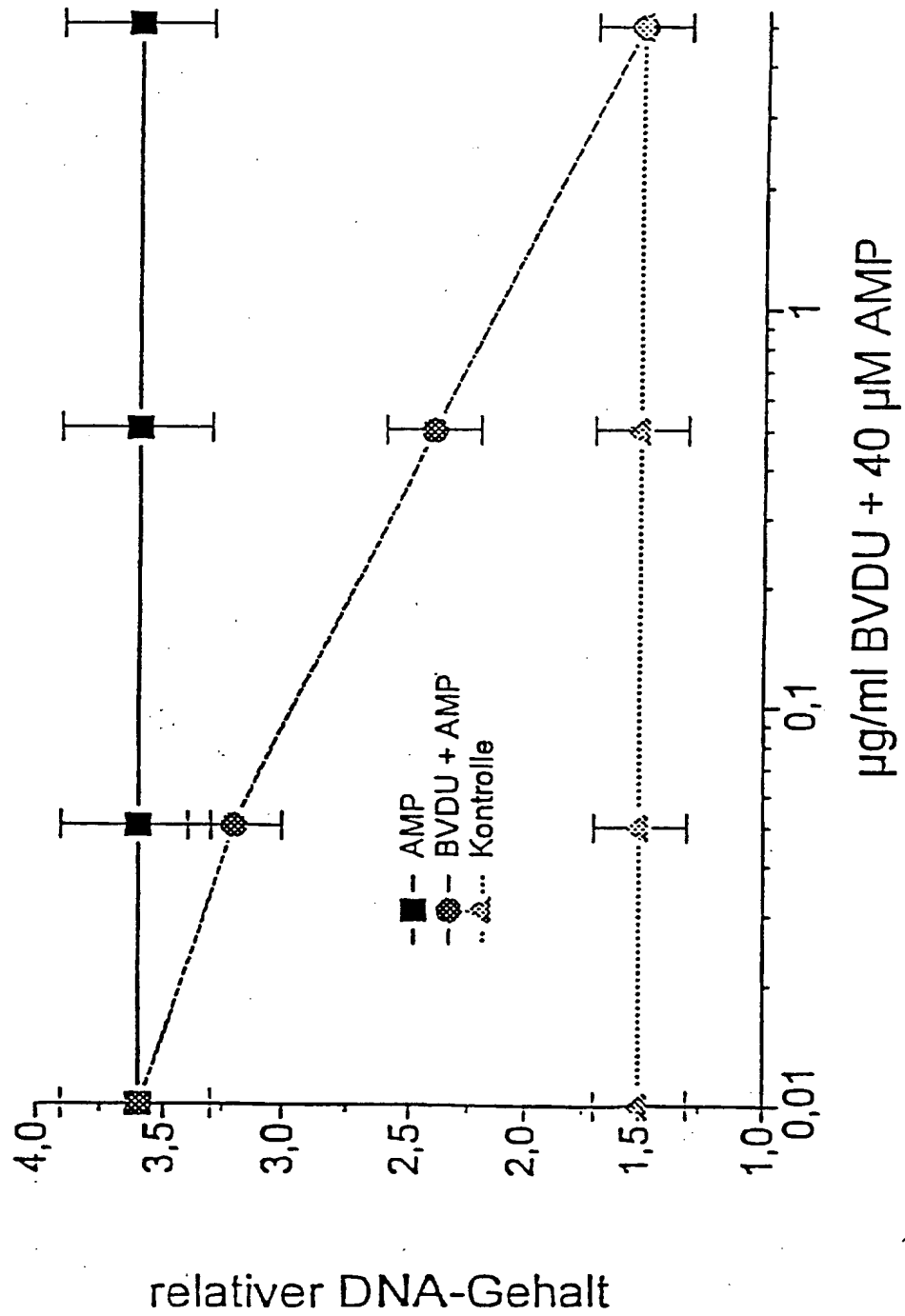
FIG. 4



ERSATZBLATT (REGEL 26)

5/15

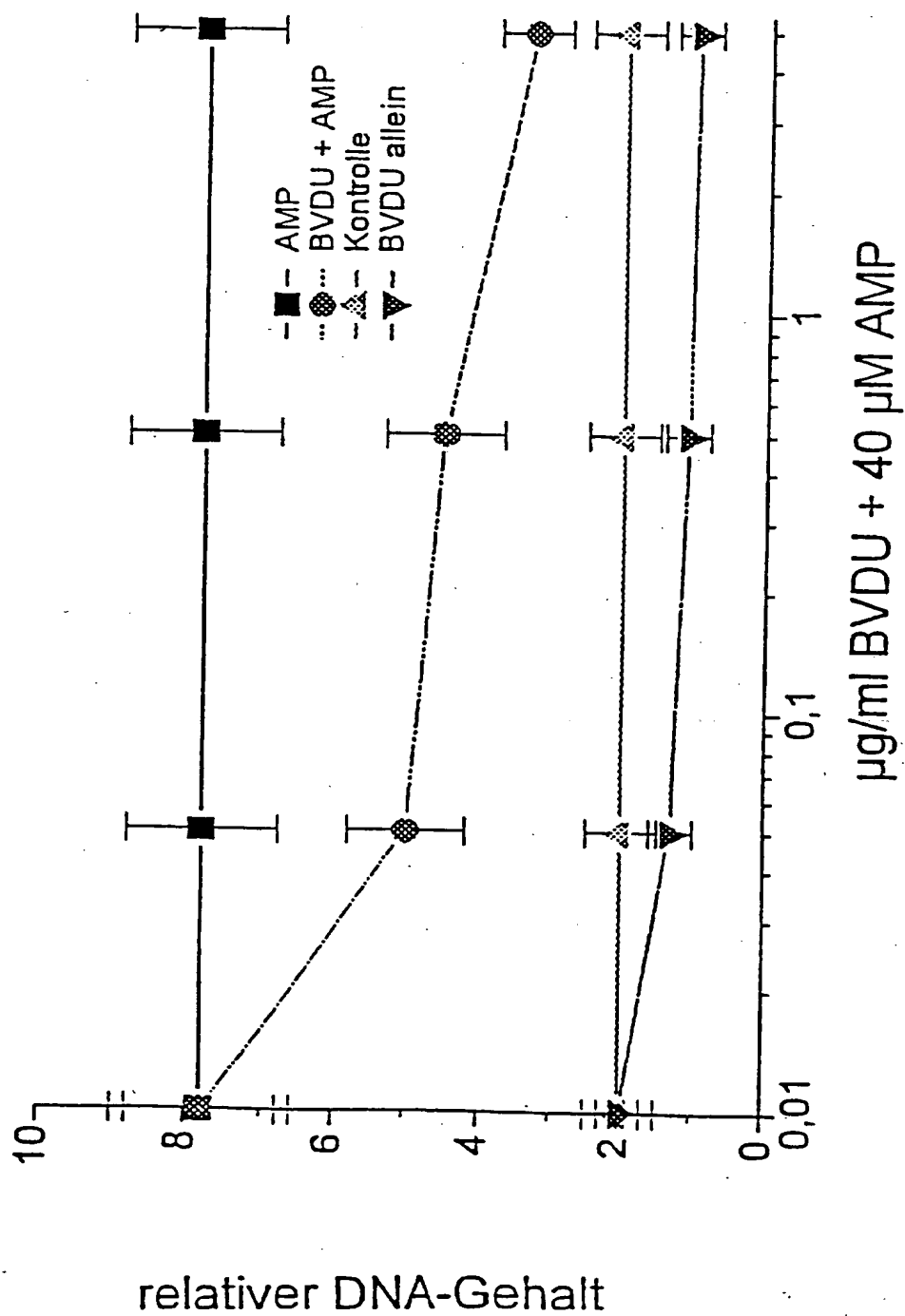
FIG. 5



ERSATZBLATT (REGEL 26)

6/15

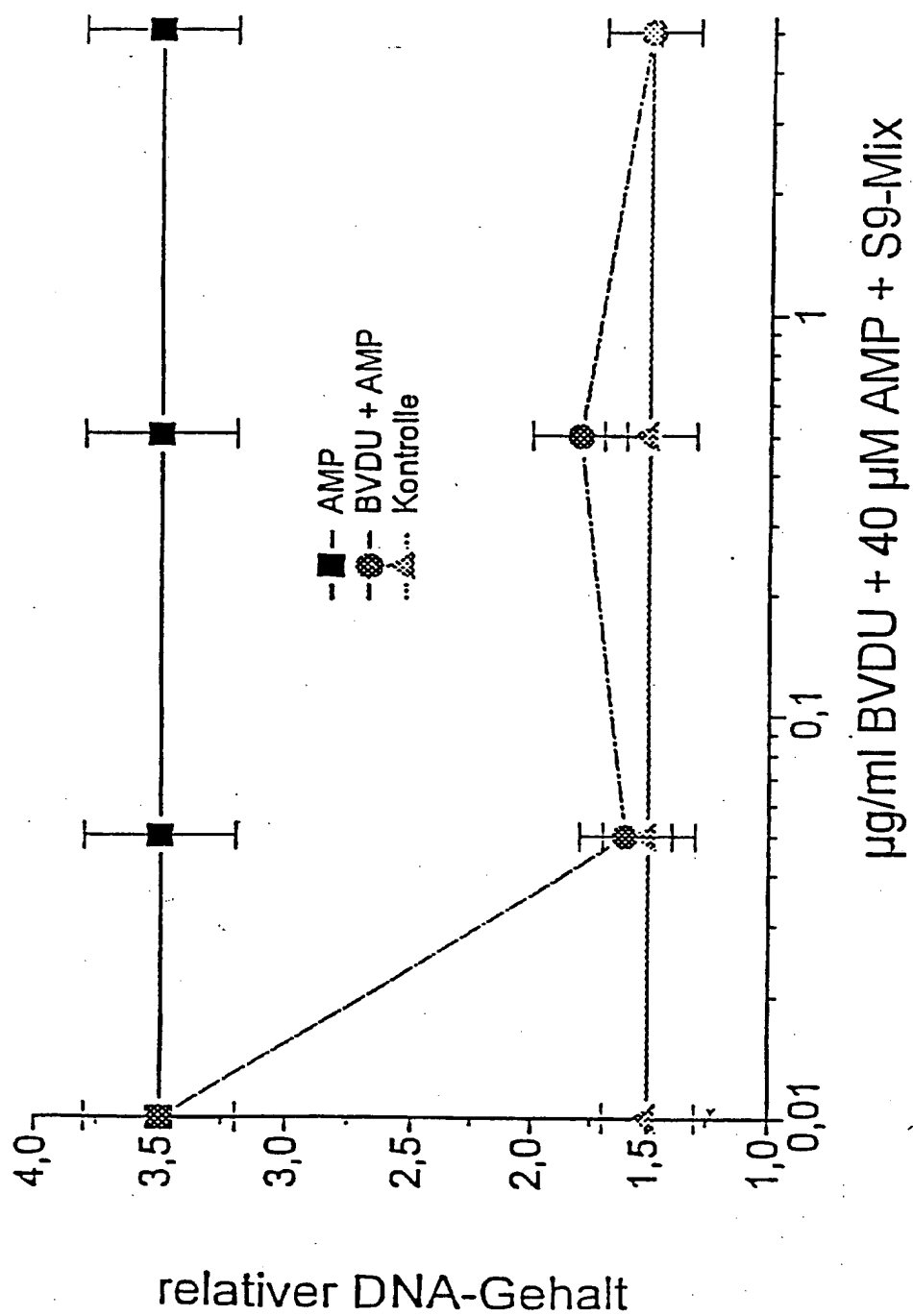
FIG. 6



ERSATZBLATT (REGEL 26)

7/15

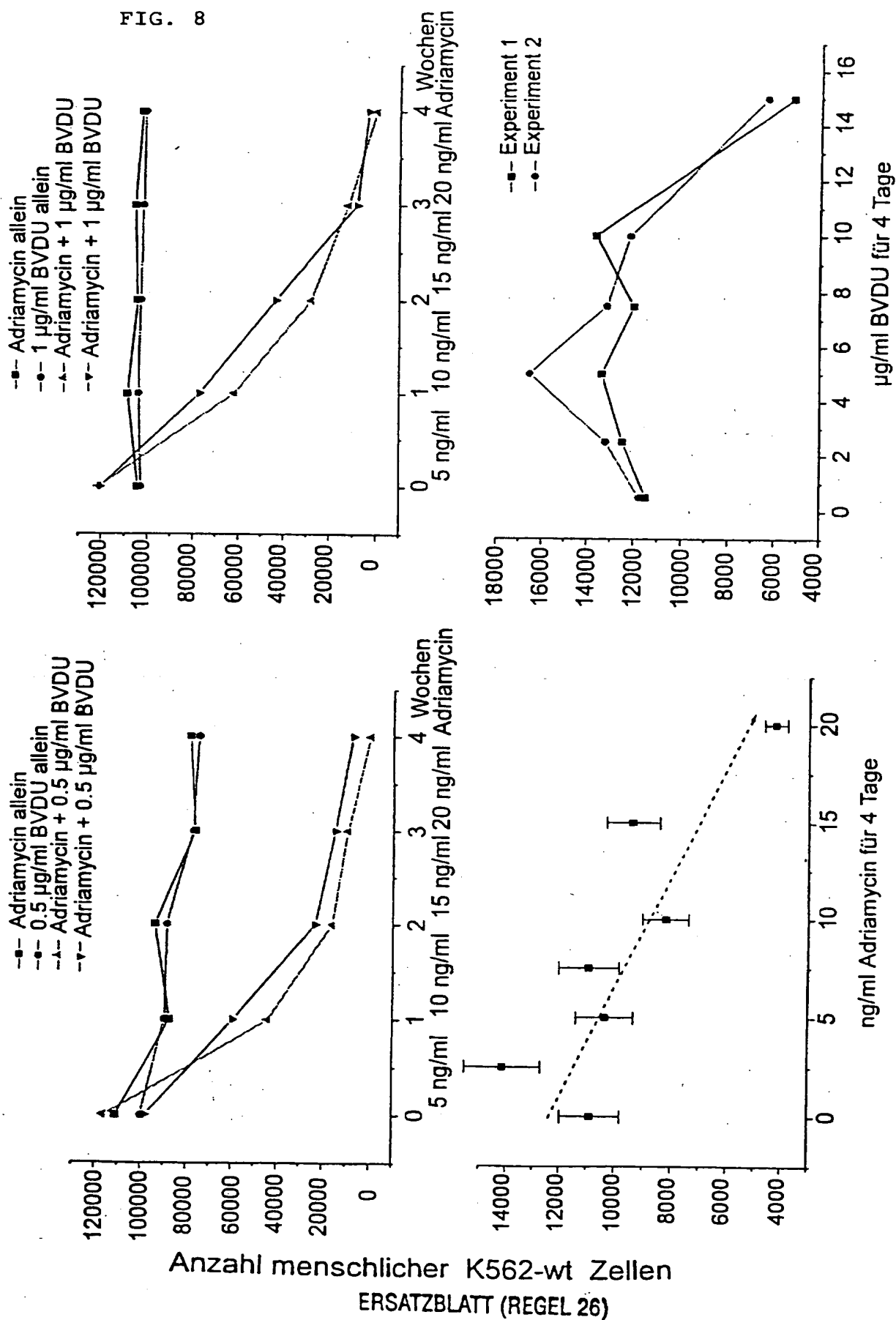
FIG. 7



ERSATZBLATT (REGEL 26)

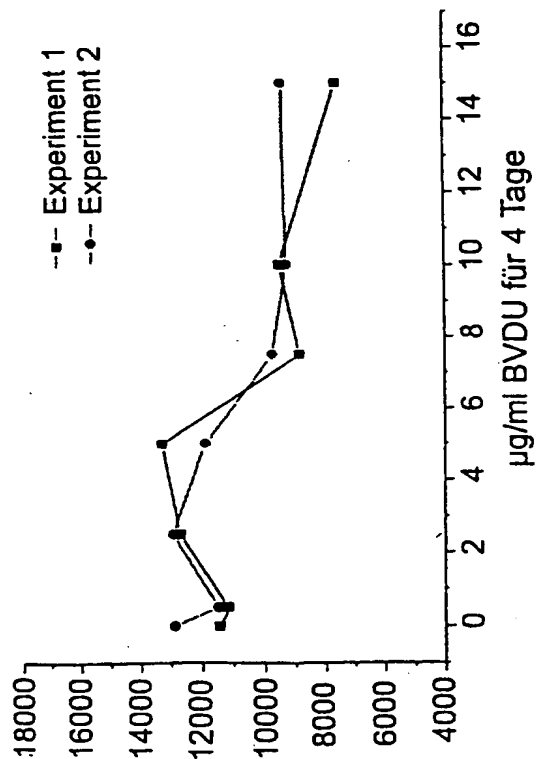
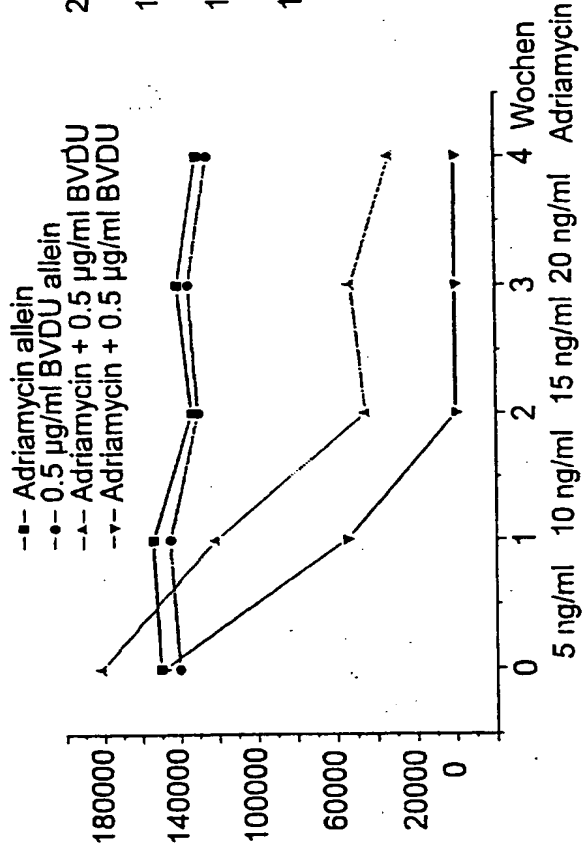
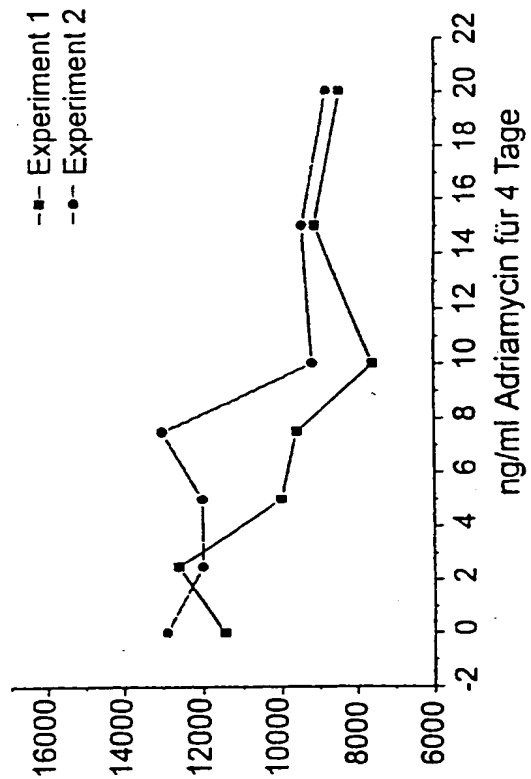
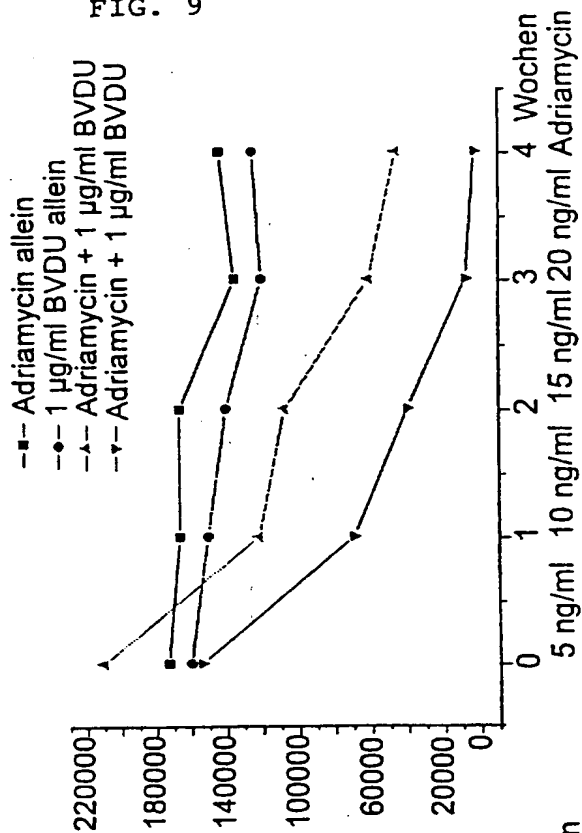
8/15

FIG. 8



9/15

FIG. 9

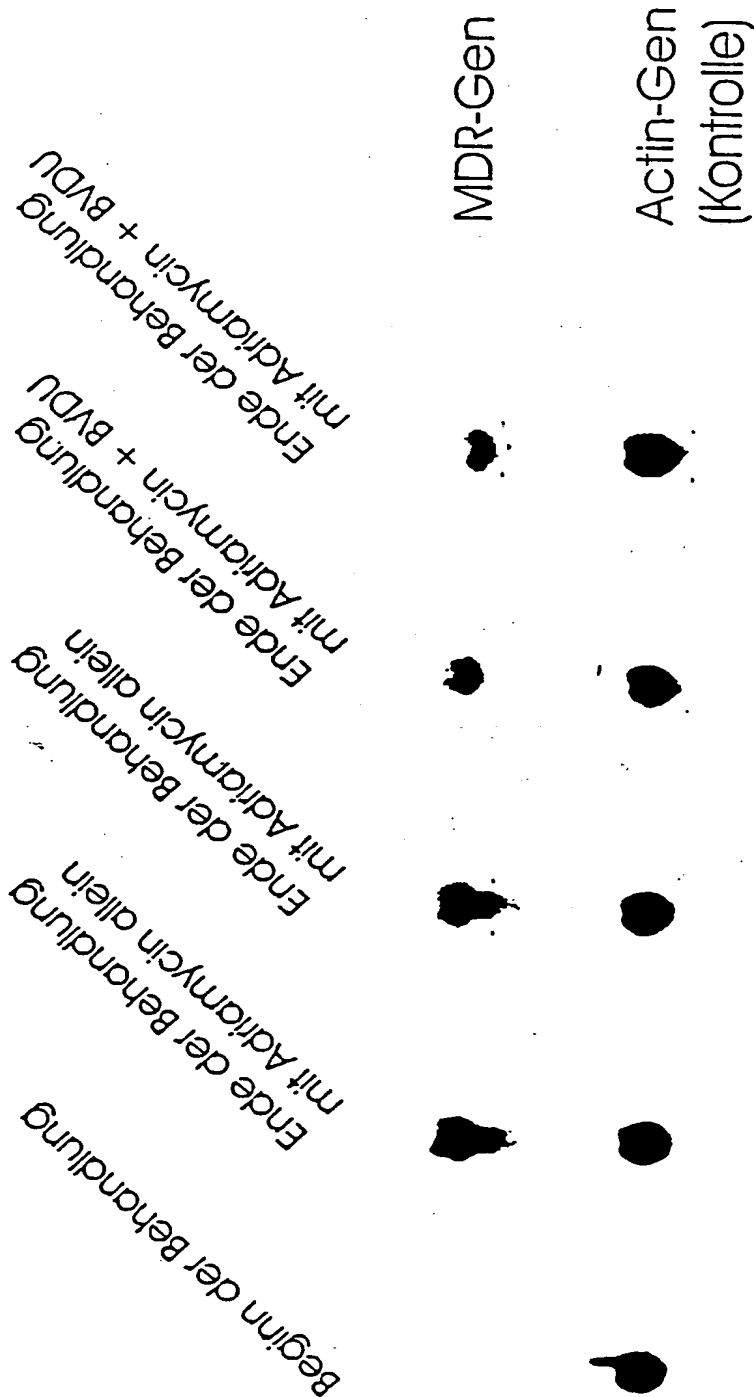


Anzahl von F4-6-wt Mauszellen
 ERSATZBLATT (REGEL 26)

10/15

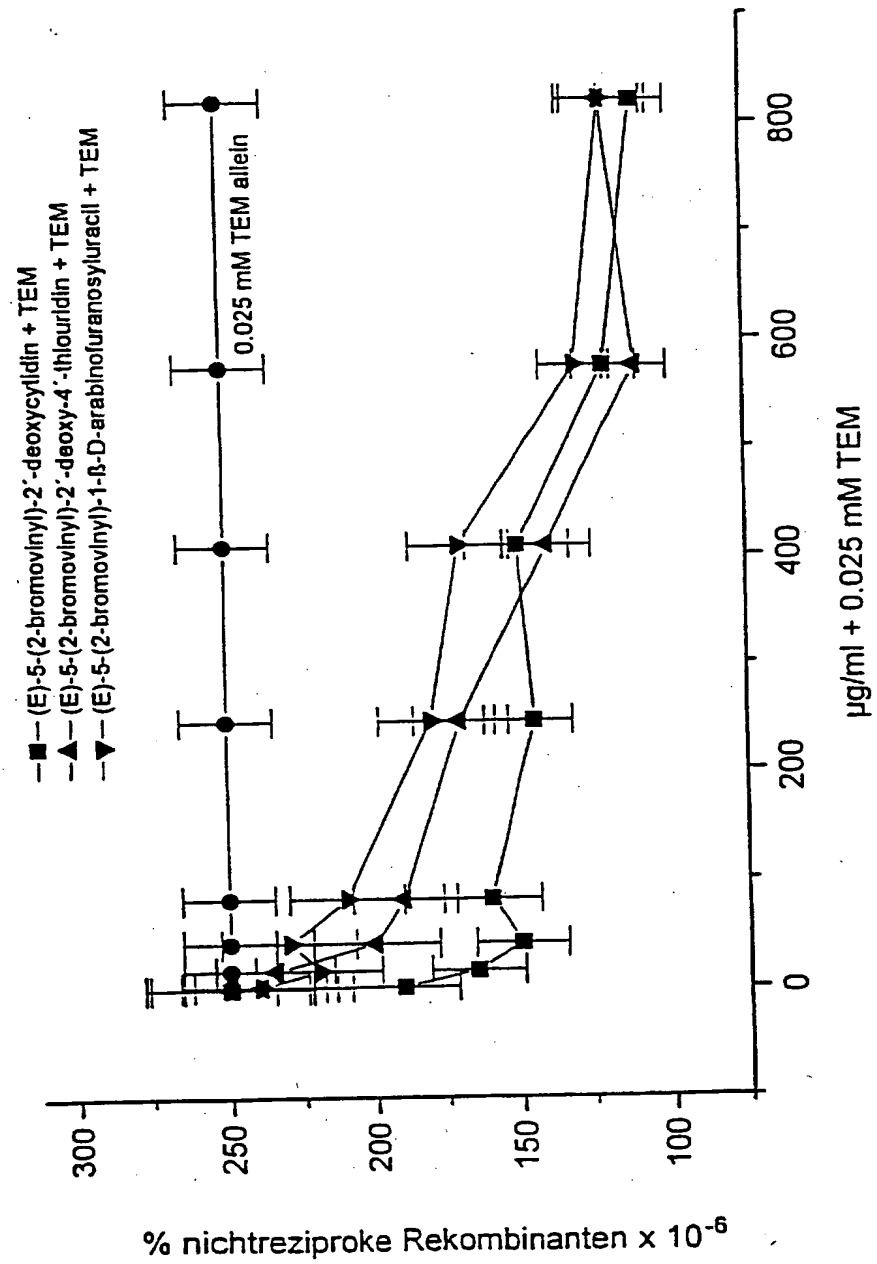
FIG: 10

Nachweis der Amplifikation des MDR-Gens in F46-WT-Zellen
mit Hilfe der Northern-Technik - Als Sonde diente das MDR-Gen



11/15

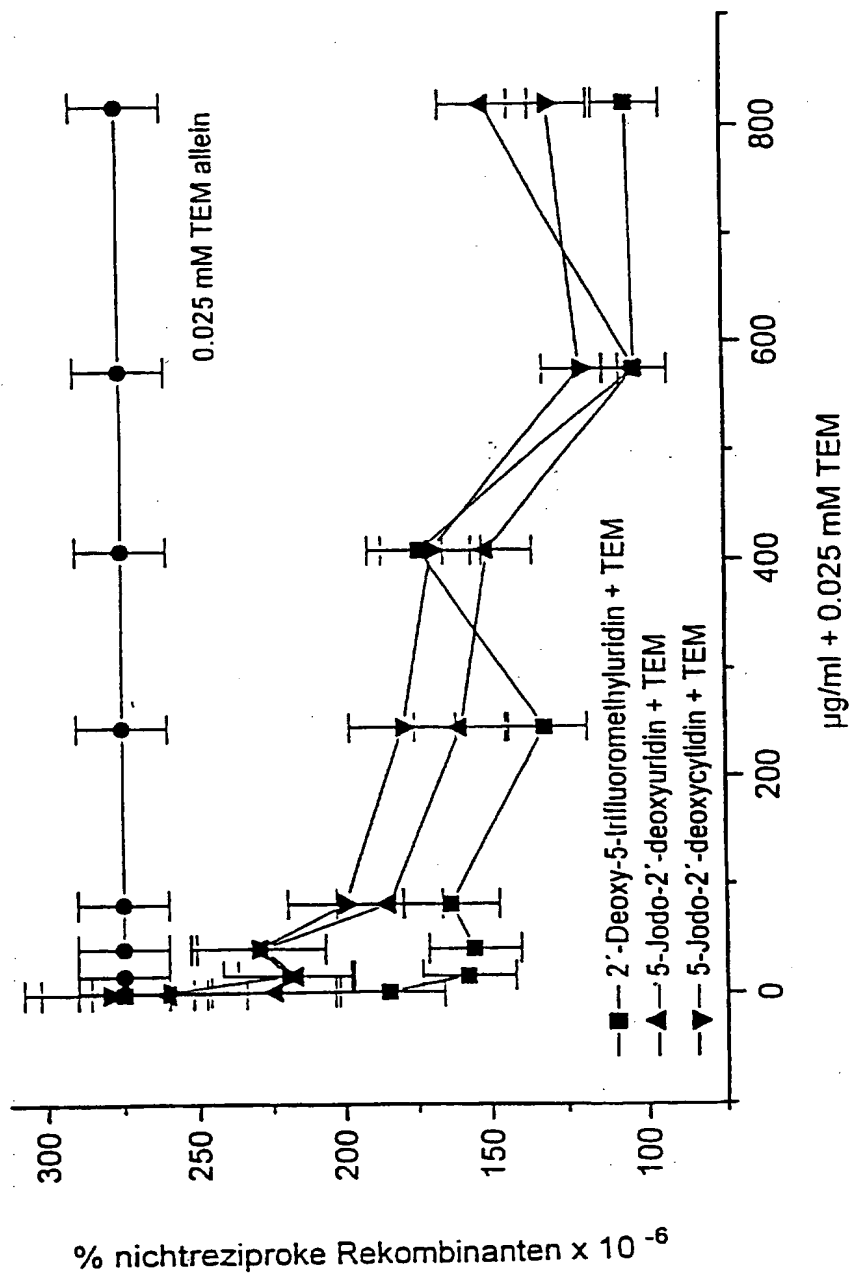
FIG. 11



ERSATZBLATT (REGEL 26)

12/15

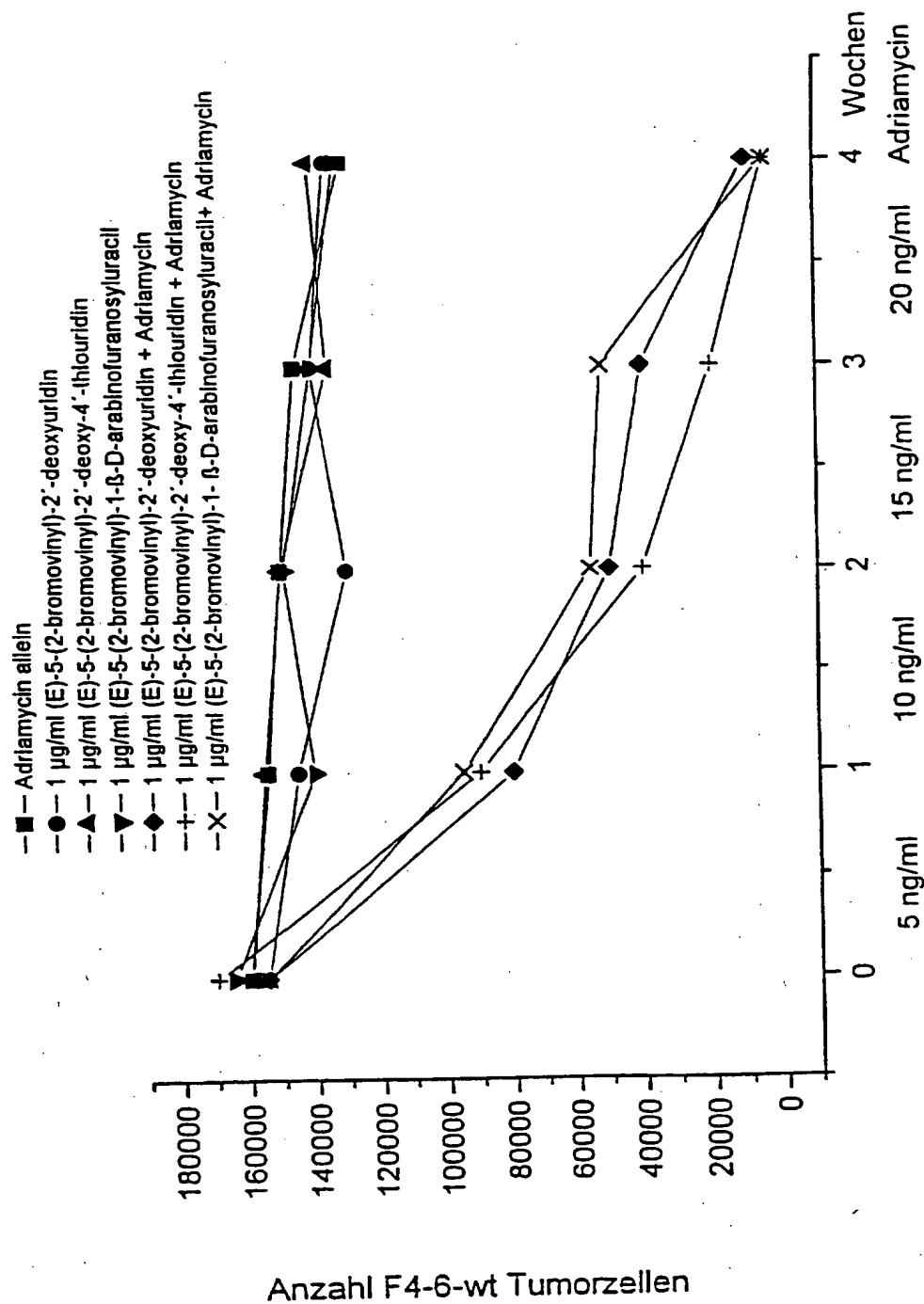
FIG. 12



ERSATZBLATT (REGEL 26)

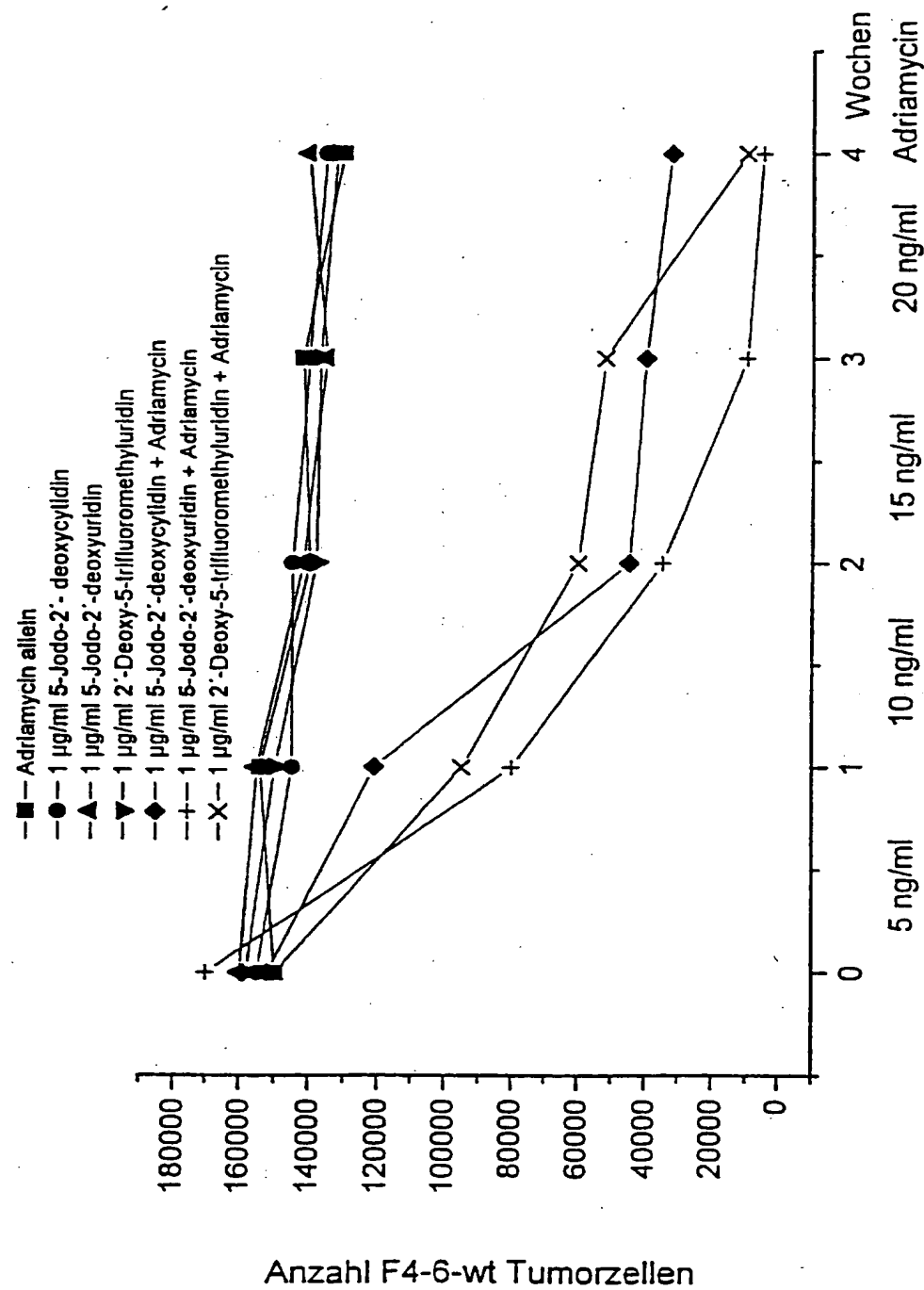
13/15

FIG. 13



ERSATZBLATT (REGEL 26)

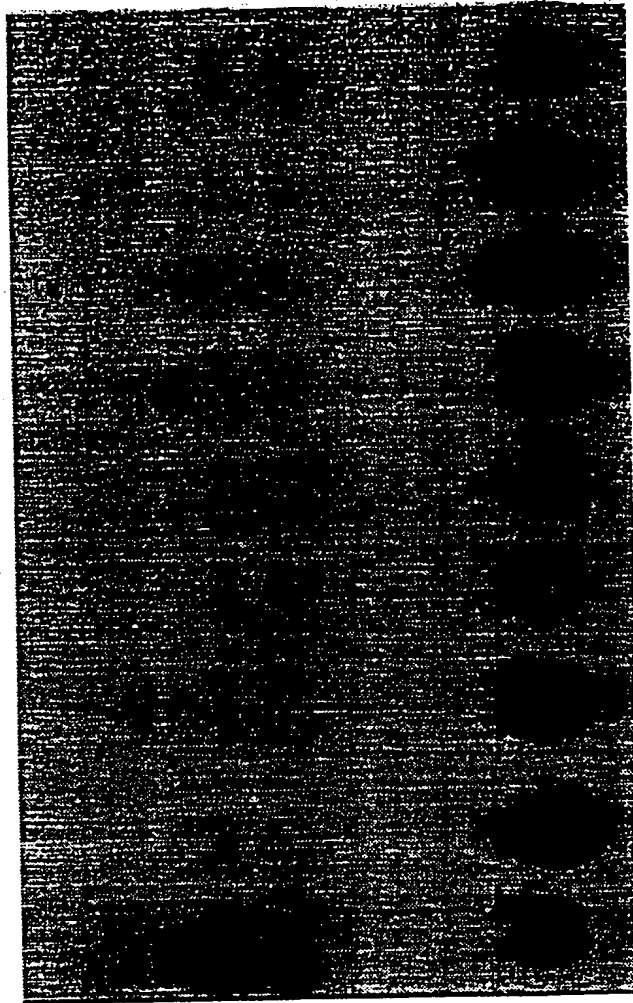
FIG. 14



15/15

FIG. 15

pos. neg. 1 2 3 4 5 6 7



mdr

β-Aktin

ERSATZBLATT (REGEL 26)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

onal Application No

PCT/DE 96/00169

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K31/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	INDIAN JOURNAL OF EXPERIMENTAL BIOLOGY, vol. 22, no. 6, 1984, pages 333-334, XP000574699 CHAKRABARTY, MISHRA: "LOSS OF PLASMID LINKED DRUG RESISTANCE AFTER TREATMENT WITH IODO-DEOXYURIDINE" see page 334 ---	1,7,11
X	TODAY'S LIFE SCIENCE, vol. 2, no. 9, 1990, pages 32-38 80, XP000575102 S. LOCARNINI: "HEPATITIS B ANTIVIRAL THERAPY" see page 37, left-hand column - page 38, middle column; table 1 ---	1,2,11
A	---	3-5,7,8
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 July 1996

Date of mailing of the international search report

15.07.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kanbier, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE 96/00169

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 1-11
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
In view of the large number of compounds which are defined by the wording of the claims, the search has been performed on the general idea and compounds mentioned in the examples of the description.

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a):

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 488 718 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 3 June 1992 see page 4; claims 1,6,8,13,15; example 6 ---	1,11
X	BE,A,640 236 (SODERSI) 16 March 1964 see page 4; claims 1-3,6,7 see page 10 ---	1,11
X	EUROPEAN JOURNAL OF CANCER & CLINICAL ONCOLOGY, vol. 20, no. 4, 1984, pages 471-476, XP000575098 WILDIERS, DE CLERCQ: "ORAL (E)-5-(2-BROMOVINYL)-2'-DEOXYURIDINE TREATMENT OF SEVERE HERPES ZOSTER IN CANCER PATIENTS" A see page 472, right-hand column; table 2 ---	1,2,11
X	CANCER RESEARCH, vol. 54, no. 10, 1994, pages 2701-2706, XP000574738 CHI, KUNUGI, KINSELLA: "IODODEOXYURIDINE CHEMOSENSITIZATION OF CIS-DIAMMINEDICHLOROPLATINUM(II) IN HUMAN BLADDER CANCER CELLS" see page 2705, right-hand column see page 2701-2 ---	1,7,11
A	J. CELL. PHARMACOL., vol. 1, no. 1, 1990, pages 2-7, XP000575045 WROBLEWSKI, HACKER: "THE POSSIBLE ROLE OF ALTERED NUCLEOTIDE METABOLISM IN CISPLATIN RESISTANCE" see page 6, left-hand column ---	1,7,11
A	GB,A,1 473 148 (RESEARCH CORPORATION) 11 May 1977 see page 1, right-hand column - page 2, left-hand column; claim 1 -----	1,11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 96/00169

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0488718	03-06-92	AT-T- 132756 DE-D- 69116321 DE-T- 69116321 JP-A- 5078256 US-A- 5250296	15-01-96 22-02-96 23-05-96 30-03-93 05-10-93
BE-A-640236	16-03-64	FR-A- 1567001 FR-M- 2824	16-05-69
GB-A-1473148	11-05-77	NONE	

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 A61K31/70

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	INDIAN JOURNAL OF EXPERIMENTAL BIOLOGY, Bd. 22, Nr. 6, 1984, Seiten 333-334, XP000574699 CHAKRABARTY, MISHRA: "LOSS OF PLASMID LINKED DRUG RESISTANCE AFTER TREATMENT WITH IODO-DEOXYURIDINE" siehe Seite 334	1,7,11
X	--- TODAY'S LIFE SCIENCE, Bd. 2, Nr. 9, 1990, Seiten 32-38 80, XP000575102 S. LOCARNINI: "HEPATITIS B ANTIVIRAL THERAPY"	1,2,11
A	--- siehe Seite 37, linke Spalte - Seite 38, mittlere Spalte; Tabelle 1 --- -/--	3-5,7,8

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- * "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- * "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- * "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- * "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- * "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

* "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

* "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

* "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

* "A" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

5. Juli 1996

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

15.07.96

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Kanbier, D

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP,A,0 488 718 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 3.Juni 1992 siehe Seite 4; Ansprüche 1,6,8,13,15; Beispiel 6 ---	1,11
X	BE,A,640 236 (SODERSI) 16.März 1964 siehe Seite 4; Ansprüche 1-3,6,7 siehe Seite 10 ---	1,11
X	EUROPEAN JOURNAL OF CANCER & CLINICAL ONCOLOGY, Bd. 20, Nr. 4, 1984, Seiten 471-476, XP000575098 WILDIERS, DE CLERCQ: "ORAL (E)-5-(2-BROMOVINYL)-2'-DEOXYURIDINE TREATMENT OF SEVERE HERPES ZOSTER IN CANCER PATIENTS" siehe Seite 472, rechte Spalte; Tabelle 2 ---	1,2,11
A	CANCER RESEARCH, Bd. 54, Nr. 10, 1994, Seiten 2701-2706, XP000574738 CHI, KUNUGI, KINSELLA: "IODODEOXYURIDINE CHEMOSENSITIZATION OF CIS-DIAMMINEDICHLOROPLATINUM(II) IN HUMAN BLADDER CANCER CELLS" siehe Seite 2705, rechte Spalte siehe Seite 2701-2 ---	9,10
X	J. CELL. PHARMACOL., Bd. 1, Nr. 1, 1990, Seiten 2-7, XP000575045 WROBLEWSKI, HACKER: "THE POSSIBLE ROEL OF ALTERED NUCLEOTIDE METABOLISM IN CISPLATIN RESISTANCE" siehe Seite 6, linke Spalte ---	1,7,11
A	GB,A,1 473 148 (RESEARCH CORPORATION) 11.Mai 1977 siehe Seite 1, rechte Spalte - Seite 2, linke Spalte; Anspruch 1 -----	1,11

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☒ Ansprüche Nr. 1-11
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
In view of the large number of compounds which are defined by the wording of the claims, the search has been performed on the general idea and compounds mentioned in the examples of the description.
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONAL RESEARCH REPORT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 96/00169

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A-0488718	03-06-92	AT-T- 132756 DE-D- 69116321 DE-T- 69116321 JP-A- 5078256 US-A- 5250296	15-01-96 22-02-96 23-05-96 30-03-93 05-10-93
BE-A-640236	16-03-64	FR-A- 1567001 FR-M- 2824	16-05-69
GB-A-1473148	11-05-77	KEINE	

THIS PAGE BLANK (USPTO)